



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Análise molecular e serológica de herpesvírus canino (CHV-1) em canídeos de canis da
Região de Lisboa e Vale do Tejo e do Distrito de Coimbra

Mariana Anjo Dias

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves Gil

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADOR

Dr. Francisco Machado da Silva

CO-ORIENTADOR

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2018

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Análise molecular e serológica de herpesvírus canino (CHV-1) em canídeos de canis da
Região de Lisboa e Vale do Tejo e do Distrito de Coimbra

Mariana Anjo Dias

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves Gil

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADOR

Dr. Francisco Machado da Silva

CO-ORIENTADOR

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2018

LISBOA

Para a minha avó, Maria.

Agradecimentos

À professora Ana Duarte, por ter aceite coorientar-me, pelo carinho com que sempre me recebeu e pela paciência com que esclareceu todas as minhas dúvidas. Foi um enorme privilégio poder contar com a sua ajuda e dedicação.

Ao Dr. Francisco Silva, pela orientação durante os meses estágios, pela disponibilidade e por todos os conhecimentos que nunca hesitou em partilhar, e, especialmente, por me ter proporcionado aprender com um dos melhores.

À professora Luísa Mateus, pela disponibilidade e pela colaboração imprescindível na recolha de amostras, que tanto enriqueceram este trabalho.

Ao professor Telmo, pela inestimável ajuda na análise estatística e pelas palavras encorajadoras.

A toda a equipa do Hospital Veterinário da Laranjeiras, pelos ensinamentos, pelo companheirismo e pela boa disposição com que pautaram os meus dias de estágio. Um agradecimento especial ao Dr. Luís Cruz por me ter aceitado na sua equipa, pelo impulso que deu a este trabalho e pelo entusiasmo contagiante com que vive a Medicina Veterinária.

À Merial, na pessoa do Doutor Pedro Fabrica, pelo financiamento, imprescindível à concretização deste trabalho.

À equipa do Laboratório de Virologia da FMV-UL, pelo apoio prestado e pela paciência com que me ensinaram.

Aos meus pais e à minha irmã, pelo amor, estabilidade e confiança que me permitiram chegar até aqui. Sem vocês, nada disto teria sido possível.

Aos meus avós, aos meus tios e aos meus primos, pela força que me transmitiram e por terem sempre acreditado em mim.

Aos amigos de sempre, em especial à Joana, ao André, ao João, à Joana, ao Paulo e ao Jinho pelas incontáveis gargalhadas, pela força e, acima de tudo, por se bastarem pela presença.

À turma D, em especial à Joana, à Tânia e à Vanessa, pelos momentos partilhados e pela amizade construída nestes anos. À Joana Mendonça, pela companhia e amizade nos momentos de aflição e nos momentos de descontração.

Aos animais de estimação que preencheram a minha vida e que, sem saberem, me ajudaram a trilhar este caminho.

Ao Dr. Pedro Ribeiro, pela disponibilidade imediata e pela ajuda que me concedeu na recolha de amostras.

Ao Sr. Licínio, pela amabilidade de me ter confiado os seus animais.

A todos os criadores e animais que participaram neste estudo.

Resumo

O herpesvírus canino tipo I (CHV-1) é um vírus, monotípico, pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus*, e que tem como hospedeiros, canídeos domésticos e selvagens. É responsável por induzir uma necrose hemorrágica sistémica fatal em cachorros com menos de três semanas de vida e por provocar sinais clínicos respiratórios, oculares e reprodutivos em cães adultos, sobretudo jovens e imunodeprimidos. Após o contacto com o vírus, este permanece latente nos tecidos linfóides e nervosos dos animais infetados, podendo haver períodos de reativação viral, geralmente associados a períodos de stress, tais como gestação, introdução de novos animais, doenças, entre outros.

O objetivo deste estudo foi a deteção molecular do ácido nucleico do CHV-1 (por *qPCR*) e deteção de anticorpos específicos contra o vírus (por imunofluorescência indireta) em cadelas de canis da Grande Lisboa e do distrito de Coimbra, e avaliar se existe uma associação entre a infeção por CHV-1 e a dimensão do canil (nº de animais), número de gestações, idade, historial de problemas reprodutivos, presença de traqueobronquite infecciosa no efetivo e a fase do ciclo éstrico. As cadelas com potencial reprodutivo são um grupo de particular interesse, uma vez que cadelas gestantes sem títulos protetores de anticorpos (o que acontece geralmente no primeiro contacto destas com o vírus) podem sofrer abortos e infertilidade. Se estes títulos se mantiverem baixos ao longo da gestação o colostro ingerido pelos cachorros não lhes irá conferir proteção contra o CHV-1.

A amostra deste estudo incluiu 49 cadelas de 11 criadores nacionais e de 2 associações de animais, às quais foi colhido sangue para análise serológica e 3 amostras por zaragatoa de secreções nasal, vaginal e ocular, para análise molecular por *qPCR*.

Todas as amostras foram negativas na análise por *qPCR*, não sendo possível detetar qualquer ADN viral nas secreções analisadas, pelo que foi concluído que nenhuma das cadelas em estudo estava a excretar o vírus. A análise serológica revelou uma proporção de 75,5% de seropositivos e observou-se uma associação significativa ($p=0.006$), entre a seropositividade e a idade dos animais, concluindo-se que, com o aumento da idade é maior a probabilidade de encontrar animais seropositivos. Dos seropositivos, 32,45% (12/37) foram positivos a IgG, 35,1% (13/37) foram positivos a IgM e 32,45% (12/37) foram positivos a IgG e IgM.

Este estudo revelou que o herpesvírus canino é, como se suspeitava, um agente bastante prevalente, nos canis nacionais.

Palavras-chave: Herpesvírus canino; cadelas; CHV-1; serologia; *qPCR*; imunofluorescência

Abstract

Canine herpesvirus type I (CHV-1) is a monotypic virus included in the family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, genus *Varicellovirus*, whose hosts are domestic and wild canids. It is responsible for a fatal systemic hemorrhagic disease in puppies less than three weeks old. It also induces respiratory, ocular and reproductive clinical signs in adult dogs, especially in young and immunocompromised animals. After contact with the virus, it remains latent in the lymphoid and nerve tissues of infected animals, interspaced with periods of viral reactivation, usually associated with stressful events such as gestation, introduction of new animals in the kennel or diseases.

The objectives of this study were the molecular detection of viral DNA (by qPCR) and the detection of virus specific antibodies (by indirect immunofluorescence) in dogs from Lisbon and Vale do Tejo Region and the district of Coimbra. The association between CHV-1 infection and the kennel size (number of animals), number of gestations, age, history of reproductive problems, the presence of canine infectious respiratory complex in the kennel and the phase of the estrous cycle was also evaluated. Bitches with reproductive potential are a group of interest, since pregnant bitches without protective antibody titers (which usually occurs on first contact with the virus) can experience abortions and infertility. If these titers remain low throughout gestation the colostrum ingested by the puppies will not provide them protection against CHV-1.

The study sample included 49 bitches, from 11 national breeders and 2 animal associations, from which blood was collected for serological analysis. Three swab samples of nasal, vaginal and ocular secretions were collected for molecular analysis by qPCR.

All samples were negative in the qPCR analysis, and it was not possible to detect any viral DNA in the analyzed secretions, so it was concluded that none of the test dogs were excreting the virus. Serological analysis revealed a proportion of 75.5% positive animals and a significant association ($p = 0.006$) was found between CHV-1 seropositivity and age. It was concluded that it is more likely to find seropositive animals in older populations. Within seropositives, 32.45% (12/37) were IgG positive, 35.1% (13/37) were IgM positive and 32.45% (12/37) were IgG and IgM positive.

As suspected, canine herpesvirus has, indeed, a high prevalence in Portuguese kennels.

Key words: Canine herpesvirus; bitches; CHV-1; qPCR; indirect immunofluorescence

Índice Geral

ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	VIII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	IX
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1. O HERPESVÍRUS CANINO	2
1.1 CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE	2
1.2. EPIDEMIOLOGIA.....	4
1.3 PATOGENIA.....	7
1.3.1 Infecção <i>in utero</i>	7
1.3.2 Infecção pós-natal em cachorros	8
1.3.3 Infecção genital em animais adultos.....	9
1.3.3 Infecção Respiratória.....	9
1.4 SINAIS CLÍNICOS.....	10
1.4.1 Cachorros recém-nascidos	10
1.4.2. Cães jovens e adultos.....	11
1.4.3. Sinais clínicos oculares.....	11
1.5 ALTERAÇÕES <i>POST MORTEM</i>	12
1.6 DIAGNÓSTICO	13
1.6.1. Diagnósticos diferenciais.....	13
1.6.2 Isolamento viral	14
1.6.3 Serologia	15
1.6.4 Diagnóstico molecular por PCR	15
1.7 TRATAMENTO.....	16
1.8 PREVENÇÃO.....	17
1.8.1 Boas práticas de criação.....	17
1.8.1 Vacinação e imunoterapia.....	18
CAPÍTULO II – ANÁLISE MOLECULAR E SEROLÓGICA DE CHV-1 EM CANÍDEOS DE CANIS DA REGIÃO DE LISBOA E VALE DO TEJO E DO DISTRITO DE COIMBRA	20
1. OBJETIVOS.....	21
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1 Caracterização da amostra	21
2.2 Colheita e conservação das amostras.....	23
2.3 Métodos de Diagnóstico	23
2.4 Análise estatística	27
3. RESULTADOS	28
3.1. Caracterização, através dos dados obtidos nos questionários, da amostra populacional estudada	28
3.2 Resultados obtidos na Imunofluorescência Indireta	32
3.3 Resultados do qPCR	33
3.4 Resultados da análise estatística efetuada.....	33
3.4 Resultados serológicos dos animais vacinados.....	35
4. DISCUSSÃO	35

5. CONCLUSÃO	41
CAPÍTULO III – RELATÓRIO DE ESTÁGIO.....	43
CAPÍTULO IV – BIBLIOGRAFIA	47
CAPÍTULO V – ANEXOS	56
ANEXO I – INQUÉRITO EFETUADO AOS TUTORES PARA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA EM ESTUDO	57
ANEXO II – RESULTADOS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E DOS INQUÉRITOS EFETUADOS	60
ANEXO III – RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DO ADN NO ESPECTROFOTÓMETRO <i>NANODROP 2000C SPECTROPHOTOMETER</i>	61

Índice de Figuras

Figura 1 – Ilustração do CHV-1 e dos seus componentes principais (www.viralzone.com)	2
Figura 2 – Organização do genoma do CHV-1 (original)	2
Figura 3 – Curvas de amplificação dos controlos negativos e do controlo positivo (standard) (original).....	25
Figura 4 – Reta de calibração para o CHV-1 (Original)	25
Figura 5 – Curvas standard da amplificação de diferentes diluições do controlo positivo (standard) (original)	26
Figura 6 – Esquema representativo do princípio de Imunofluorescência Indireta utilizada no estudo, ilustrando a detecção de IgG e IgM (original)	27
Figura 7 – Representação gráfica dos resultados da imunofluorescência indireta e das diferentes combinações entre imunoglobulinas e as suas combinações	32
Figura 8 – Curvas de amplificação de amostras negativas e dos controlos negativos e positivo (standard) (original)	33

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Prevalência de CHV-1 em diversos pontos do mundo.....	5
Tabela 2 – Diagnósticos diferenciais de abortos e mortalidade neonatal (Poulet, 2005)	14
Tabela 3 – Número de canis e de animais por canil.....	22
Tabela 4 – <i>Primers</i> e sonda utilizados no qPCR para amplificação da sequência de CHV-1 e localização e dimensão do fragmento (Decaro et al., 2010)	24
Tabela 5 – Número de moléculas presentes em cada diluição.....	26
Tabela 6 – Valores de <i>p</i> obtidos para cada variável, calculados através do Teste Exato de Fischer	33

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Distribuição da amostra por idades.....	28
Gráfico 2 – Distribuição da amostra por nº de gestações de cada cadela	29
Gráfico 3 – Distribuição da amostra pela dimensão do canil que habitam	29
Gráfico 4 – Distribuição da amostra por estatuto vacinal de cada cadela.....	30
Gráfico 5 – Distribuição da amostra por presença de TIC no efetivo.....	30
Gráfico 6 – Distribuição da amostra por historial de problemas reprodutivos	31
Gráfico 7 – Distribuição da amostra por fase do ciclo éstrico	31
Gráfico 8 – Proporção de animais positivos e negativos na análise por imunofluorescência indireta	32
Gráfico 9 – Distribuição dos animais positivos e negativos por classes de idade	34
Gráfico 10, 11, 12 e 13- Distribuição de animais positivos e negativos pelas variáveis nº de gestações, dimensão do canil, fase do ciclo éstrico e existência de problemas reprodutivos..	34
Gráfico 14 e 15 – Distribuição de animais positivos e negativos pelas variáveis estatuto vacinal e presença ou ausência de TIC no efetivo do canil a que pertencem.....	35
Gráfico 16 – Estatuto serológico dos animais vacinados.....	35

Índice de Abreviaturas

% - Percentagem

°C – Graus Celcius

ADN - Ácido desoxirribonucleico

CHV-1 – *Canine Herpesvirus 1* (Herpesvírus canino 1)

Ct - *Cycle threshold*

EHV – *Equine Herpesvirus* (Herpesvírus equino)

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático)

Fc – Fragmento cristalizável

FHV-1 – *Feline Herpesvirus 1* (Herpesvírus felino 1)

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

gD – Glicoproteína D

HSV – *Herpes simplex virus* (Herpesvírus Simplex)

MDCK – *Madin-Darby canine kidney*

mL – Mililitro

ng – Nanograma

nm – nanómetro

PBS – *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato salino)

PCR - *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PrV – Pseudorabies virus (Vírus da Pseudorraiva)

IFI – Imunofluorescência indireta

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IPMA – *Imunoperoxidase monolayer assay* (teste da imunoperoxidase)

RTq-PCR – *Real Time quantitative PCR* (PCR quantitativo em tempo real)

TIC – Traqueobronquite infecciosa canina

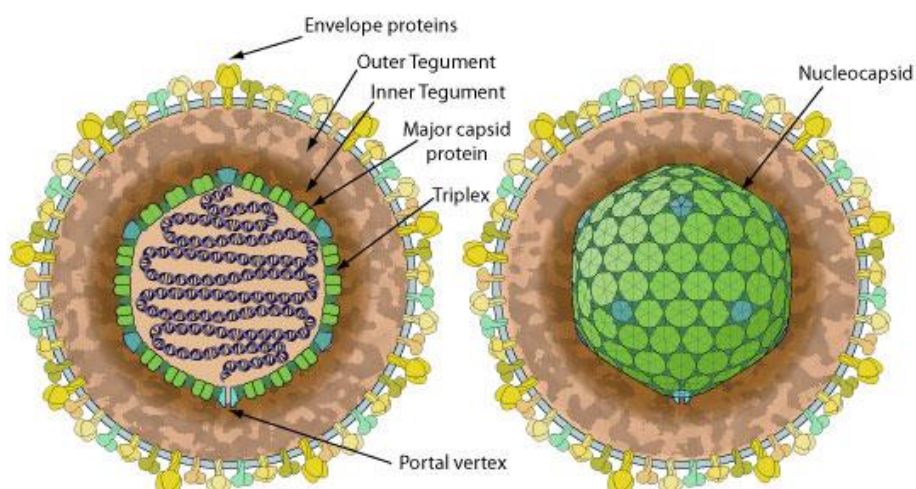
Capítulo I - Revisão Bibliográfica

1. O Herpesvírus Canino

1.1 Caracterização do agente

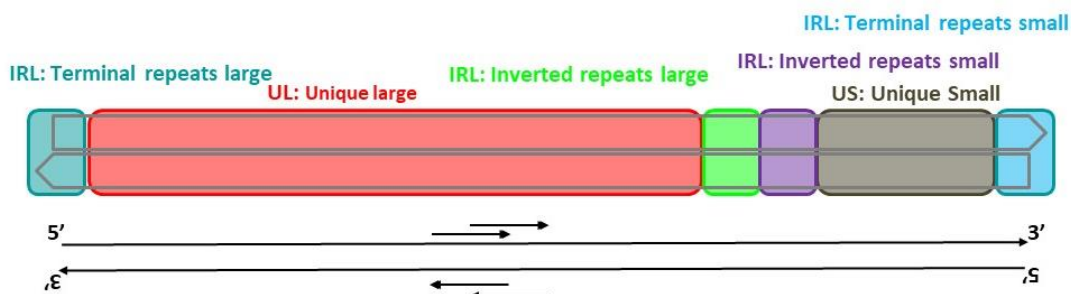
O Herpesvírus canino tipo I (CHV-1) é um vírus pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* e descrito como monotípico (Decaro, Martella, & Buonavoglia, 2008). O virião, com um diâmetro de 115 a 175nm, é composto por uma cadeia dupla de ADN envolta por uma nucleocápside icosaédrica, um tegumento de composição proteica e um invólucro lipídico (Fontbonne, 2011) (Figura1).

Figura 1 – Ilustração do CHV-1 e dos seus componentes principais (www.viralzone.com)



A organização genómica do CHV-1 inclui uma *unique large sequence* e uma *unique small sequence* flanqueadas, respetivamente, por uma *terminal* e uma *inverted repeats large* e uma *terminal* e uma *inverted repeats small* (Figura 2).

Figura 2 – Organização do genoma do CHV-1 (original)



A sua replicação é semelhante à de outros alfa herpesvírus: a síntese do ADN viral e a montagem na nucleocápside ocorre dentro do núcleo da célula hospedeira, com o envólucro viral a ser adquirido na membrana nuclear. Os viriões são transportados através do retículo endoplasmático e aparelho de Golgi até à superfície celular e libertados para o exterior (Green, 2012).

Visto ser um vírus com envólucro, o CHV-1 é rapidamente inativado pela exposição à maioria dos desinfetantes e solventes lipídicos (como por exemplo o éter e o clorofórmio) e por temperaturas de 56 °C durante 5 a 10 minutos, 50 °C durante 1 hora e 37 °C durante 22 a 24 horas. Embora permaneça estável durante 5 dias a -20 °C, a sua capacidade de infeção diminui progressivamente com o tempo, ficando inativado ao fim de 28 dias a esta temperatura. Porém, a adição de compostos estabilizadores, como o soro fetal bovino, aumenta a sua estabilidade em temperaturas inferiores a -70 °C. É estável a um pH entre 6,5 e 7,6 mas é rapidamente destruído a um pH abaixo de 5,0 (Carmichael, Squire, & Krook, 1965; Poste, 1972; Spertzel, Huxsoll, McConnell, Binn, & Yager, 1965). Isolado e caracterizado pela primeira vez em 1965 (Carmichael, Strandberg, & Barnes, 1965; Spertzel et al., 1965; Stewart, David-Ferreira, Lovelace, Landon, & Stock, 1965) atinge canídeos domésticos e selvagens, especialmente jovens ou imunodeprimidos, causando necrose tecidual a nível local, nas mucosas, ou provocando uma infeção sistémica generalizada (Green, 2012).

O CHV-1 tem uma gama de células hospedeiras relativamente pequena quando comparado com outros alfa herpesvírus, tais como o Herpesvírus Simplex (HSV) ou o vírus da pseudorraiva (PrV), crescendo apenas em culturas de células obtidas a partir da cultura de células primárias de origem canina, das quais as mais utilizadas são as células renais caninas Madin-Darby (MDCK) (Nakamichi, Ohara, Matsumoto, & Otsuka, 2000).

A especificidade dos herpesvírus está relacionada com o padrão de diferentes glicoproteínas que cada herpesvírus possui no seu envólucro viral, devido à sua funcionalidade no processo de infeção de células suscetíveis e no desencadear da resposta imunitária dos hospedeiros respetivos. No caso do CHV-1, as principais glicoproteínas envolvidas na resposta imunitária e nas fases de fixação e penetração das células suscetíveis são a glicoproteína B (gB), a gC e a gD, sendo a gB a que desencadeia uma resposta imunitária mais forte (Xuan et al., 1992, 1997). Destas três glicoproteínas a gD é a única cuja seroneutralização não estimula a ativação do complemento, sendo também responsável pela hemaglutinação de eritrócitos, tal como acontece com as gD de outros herpesvírus (Maeda et al., 1996, 1997). Além destas estão também descritas glicoproteínas que desempenham um papel importante na transmissão do vírus entre células e na formação de sincícios, tais como a gE e a gI (Nishikawa, Xuan, &

Otsuka, 1998). A especificidade que é conferida pelas glicoproteínas do involucro viral é complementada pela existência de recetores específicos nas células do hospedeiro, cuja ausência impede a penetração do vírus na célula (Nakamichi, Ohara, Matsumoto, & Otsuka, 2000).

Apesar desta especificidade dos herpesvírus e ainda que o CHV-1 nunca tenha sido isolado em gatos, e que a inoculação, em laboratório, de FHV-1 em cães não tenha produzido sinais de infecção (Kramer, Evermann, Leathers, McKeirnan, & Rashti, 1991), está descrita a presença de um vírus com propriedades biológicas e antigénicas consistentes com o FHV-1 em 5 casos de cachorros com enterite, não sendo, assim, clara a inexistência de infecções cruzadas. O mesmo estudo sugere uma reação antigénica unidirecional entre o FHV-1 e o CHV-1, uma vez que se observou uma seroneutralização baixa, mas consistente, do CHV-1 pelo soro hiperimune anti-FHV-1, mas a mesma seroneutralização não ocorreu quando da utilização do soro hiperimune anti-CHV contra o FHV-1 (Evermann, McKeirnan, Ott, & Reed, 1982).

Não se sabe exatamente até que ponto as infecções cruzadas entre espécies dos diversos herpesvírus têm relevância clínica, mas a inoculação intranasal de herpesvírus equino 9 (EHV-9) em cinco cães provocou perda de peso, pirexia, anorexia e sinais neurológicos quatro dias depois da mesma. O vírus EHV-9 foi recuperado dos cérebros e, histologicamente, observou-se uma encefalite fulminante não supurativa. O bulbo olfativo e os lobos frontal e temporal foram as regiões predominantemente afetadas. A imuno-histoquímica revelou reatividade para o antígeno de EHV-9 nos neurónios. Todos os cães apresentavam broncopneumonia leve e vários graus de necrose linfóide. Estes achados indicam que os cães podem ser suscetíveis ao EHV-9 (Yanai et al., 2003).

Também a inoculação de uma estirpe não patogénica de HSV-1 em dois cães produziu uma infecção latente. Não se verificou, porém, quaisquer sinais clínicos de infecção aguda. (Springer et al., 2001).

1.2. Epidemiologia

O CHV-1 não é estável no ambiente, mas é mantido na natureza pela sua permanência em estado latente nos canídeos domésticos e selvagens e pela disseminação ativa pelos animais infetados. O CHV-1 é um vírus sensível à temperatura, com replicação ótima a 35-36° °C. Um aumento de temperatura para 37 °C durante 5 horas é o suficiente para uma diminuição significativa na infecciosidade do virião (Fontbonne, 2011). O vírus persiste nos tecidos ganglionares e linfóides das mucosas oronasais e genitais. A latência no organismo é típica dos

Herpesvírus e muitos dos animais infetados apresentam durante toda a sua vida apenas uma infecção subclínica. Após reativação, o CHV-1 replica-se nas mucosas com temperaturas mais baixas (Decaro, Martella, & Buonavoglia, 2008; Lust & Carmichael, 1971) e ocorre a disseminação pelas secreções oronasais ou genitais dos animais infetados, propagando-se a outros canídeos através do contacto direto destes com essas secreções. As recidivas do vírus ocorrem, geralmente, quando os animais estão sujeitos a condições de stress, como elevada densidade populacional, transporte, gestação ou terapias imunossupressoras (Green, 2012).

O CHV-1 é um vírus ubiquitário e a sua prevalência varia bastante quer entre países, quer entre canis. Canis com um maior número de animais albergam cães com títulos de anticorpos mais elevados, assim como canis onde está documentada a presença de traqueobronquite infecciosa, (Kawakami et al., 2010) e naqueles com práticas de higiene questionáveis, o que reforça a importância da transmissão oronasal. Outro fator que reforça a importância desta via de transmissão é a similitude dos padrões de anticorpos existente entre fêmeas nunca sujeitas a cópula e fêmeas já cobertas, sugerindo que esta via pode ser a principal forma de propagação do vírus e não a venérea (Krogenæs et al., 2014; Veerle Ronsse et al., 2005; Ronsse, Verstegen, Onclin, Farnir, & Poulet, 2004), embora outros autores considerem a transmissão venérea mais relevante do ponto de vista epidemiológico (Babaei, Akhtardanesh, Ghanbarpour, & Namjoo, 2010).

Van Gucht, Nauwynck e Pensaert (2001) demonstraram também um aumento da seroprevalência em animais com problemas de fertilidade e estudos mais recentes corroboraram essa conclusão (Dahlbom, Johnsson, Myllys, Taponen, & Andersson, 2009)

Países como a Noruega, tem estudos que demonstram uma prevalência superior a 80% (Krogenæs et al., 2012) (Krogenæs et al., 2014), enquanto que no sul de Itália a seroprevalência estimada é de 19% (Pratelli, Colao, & Losurdo, 2014). Apesar de serem descritos valores de seroprevalência muito variável entre países e regiões (Tabela 1) parte dessa diferença pode ser atribuível aos diferentes métodos laboratoriais utilizados na sua determinação.

Tabela 1 – Prevalência de CHV-1 em diversos pontos do mundo

País	Prevalência	Teste utilizado	Referência
África do Sul	22%	<i>ELISA</i>	(Nöthling, Hüseyin, Steckler, & Ackermann, 2008)
Bélgica	45,75%	<i>ELISA</i>	(Ronsse et al., 2002)

Finlândia	81.5%	<i>IPMA</i>	(Dahlbom, Johnsson, Myllys, Taponen, & Andersson, 2009)
Holanda	42.1%	<i>ELISA</i>	(Rijsewijk, Luiten, J. Daus, Van Der Heijden, & Van Oirschot, 1999)
Inglaterra	88%	<i>ELISA</i>	(Reading & Field, 1998)
Irão	20.7%	<i>IFI</i>	(Babaei, Akhtardanesh, Ghanbarpour, & Namjoo, 2010)
Itália	14.6% a 18.6%	<i>Seroneutralização e IFI</i>	(Pratelli, Colao, & Losurdo, 2014)
Japão	22% a 26%	<i>ELISA</i>	(Kawakami et al., 2010; Takumi et al., 1990)
Lituânia	85%	<i>ELISA</i>	(Abhinay, Joseph, & Ambily, 2013)
México	87%	<i>ELISA</i>	(Lara et al., 2016)
Noruega	80% a 85.5%	<i>IPMA</i>	(Krogenæs et al., 2012)
Peru	17%	<i>IFI</i>	(Góngora , Sandoval & Manchego, 2007)
Suécia	100%	<i>IPMA</i>	(Ström Holst et al., 2012)
Turquia	39.3%	<i>ELISA</i>	(Yeşilbağ, Yalçın, Tuncer, & Yilmaz, 2012)

Até ao presente, não existe qualquer indicação de raças com maior predisposição e no que diz respeito à idade, parece existir um aumento progressivo da seroconversão com a idade, possivelmente explicado pelo maior contacto com outros animais, por exemplo, através das cobrições (Ronsse et al., 2004).

A sequenciação genética de 3 estirpes de CHV-1 recolhidas ao longo de 15 anos, demonstrou que a variabilidade genética entre os isolados é muito pequena, partilhando uma homologia de 98,98%. O vírus filogeneticamente mais próximo é o FHV-1, seguido dos herpesvírus equinos (Papageorgiou et al., 2016). Estudos anteriores já haviam determinado uma relação filogenética próxima entre a sequência genética da gD do *Phocid* herpesvírus e as sequências da gD do FHV-1 e do CHV-1 (Martina, Harder, & Osterhaus, 2003).

1.3 Patogenia

Nos cachorros a infecção pelo CHV pode ocorrer no útero, na passagem pelo canal vaginal, no contacto com outros cachorros infetados ou com as secreções oronasais da mãe, ou mesmo através de fomites, embora com menor importância. Recém-nascidos, com menos de uma semana, são particularmente suscetíveis a infecções generalizadas, apresentando elevada mortalidade. Os cachorros com mais de 3 semanas são relativamente resistentes e geralmente desenvolvem sintomas clínicos ligeiros ou inaparentes (Decaro, Martella, & Buonavoglia, 2008).

Em cães mais velhos, o vírus desenvolve-se nas mucosas da nasofaringe, trato genital, e amígdalas, com disseminação posterior para órgãos alvo como os linfonodos retrofaríngeos, linfonodos brônquicos, rins, baço, e, ocasionalmente, pulmões. Em adultos com uma resposta imunitária competente contra o vírus, este integrar-se-á no ADN celular do hospedeiro e, com poucos ou nenhuns sinais clínicos, permanecerá latente em tecidos nervosos e linfoides para o resto da vida dos animais (Fontbonne, 2011; Green, 2012).

Através da utilização de PCR, Miyoshi et al. (1999), detetou a presença de CHV-1 nos gânglios trigeminal e lombossacral e nos linfonodos retrofaríngeo, mediastínicos e hipogástrico, bem como nas tonsilas, confirmando a latência do CHV-1 nos tecidos nervosos e linfoides. No mesmo estudo, o genoma viral não foi detetado no sangue periférico e o vírus foi isolado apenas a partir das zaragatoas nasais tanto de cães inoculados intranasalmente, como de cães inoculados por via intravenosa e nasal, até quatro ou seis dias após inoculação, assim como a partir de zaragatoas nasais e vaginais de cães inoculados intravaginalmente, até quatro ou seis dias após a inoculação, demonstrando a importância que a via de inoculação tem no local de replicação e disseminação do vírus pelo animal.

A inexistência de sinais clínicos em raposas (*Vulpes vulpes*) inoculadas *per os* e a existência dos mesmos em raposas com inoculação intravenosa sugerem que a imunidade nas mucosas desempenha um papel importante na patogenia do vírus (Reubel et al., 2001).

Outro estudo documenta a presença do vírus no aparelho vestibular canino, não concluindo, porém que haja uma relação entre o CHV-1 e a existência de patologia vestibular (Parzefall, Fischer, Blutke, Schmahl, & Matiassek, 2011).

1.3.1 Infecção *in utero*

O contacto com o vírus por cadelas gestantes que não tenham títulos protetores de anticorpos, apresenta uma ameaça à gestação (Fontbonne, 2011).

Embora a forma mais comum de infecção dos cachorros não seja a via transplacentária, esta pode ocorrer, tendo diferentes consequências consoante o tempo da gestação. Foram relatados casos de infertilidade, mumificação e aborto de cachorros nados-mortos em cadelas sem sinais clínicos, após a inoculação intravenosa do vírus do 47º dia ao 53º dia de gestação.

À necropsia dos fetos podem observar-se focos de necrose com corpos de inclusão intranucleares no fígado, baço, rim e coração. (Hashimoto, Hirai, Yamaguchi, & Fujimoto, 1982). Num outro estudo, a utilização de ecografia no primeiro terço da gestação mostra a existência de reabsorção embrionária (Ronsse et al., 2005).

As placentas podem apresentar necrose multifocal, com antigénio viral e corpos de inclusão no epitélio do trofoblasto e as células endoteliais. Os vasos sanguíneos alantóicos podem ser afetados por degenerescência da sua parede e vasculite (Hashimoto, Hirai, Okada, & Fujimoto, 1979; Hashimoto et al., 1982).

Alguns cachorros podem sobreviver à infecção sem evidenciar sinais clínicos de infecção, mantendo o vírus latente nos seus tecidos. No entanto, a maioria dos cachorros desenvolve infecção sistémica fatal, até nove dias após o nascimento (Green, 2012; Hashimoto et al., 1982).

1.3.2 Infecção pós-natal em cachorros

Além da via transplacentária, os neonatos são infetados durante a passagem pelo canal vaginal ou no pós-parto pelo contacto com secreções oronasais de animais excretadores do vírus, que atinge a mucosa oronasal e tonsilas e em 24 horas se replica nestes tecidos. O vírus entra, então, na corrente sanguínea através dos macrófagos provocando uma virémia intracelular que resulta na disseminação viral pelo organismo em 3 a 4 dias após a inoculação. A localização do vírus nas células fagocitárias mononucleares dos linfonodos e do baço resulta numa disseminação de célula para célula e hiperplasia e necrose linfoides. Ocorre uma necrose hemorrágica multifocal em vários órgãos, nomeadamente nos rins, baço, pulmões, fígado e glândulas adrenais. (Green, 2012; Yanagisawa et al., 1987).

Alguns neonatos apresentam lesões no Sistema Nervoso Central (SNC), causadas por via hematógica ou através da infecção axonal do gânglio trigeminal, mas a gravidade da infecção causa a morte destes cachorros sem que seja possível observar-se sinais clínicos neurológicos (Green, 2012; Smith, 1997).

As ninhadas de recém nascidos infetados apresentam, muitas vezes, uma mortalidade de 100% e os que sobrevivem apresentam graves sequelas como encefalite granulomatosa ou displasia da retina (Percy, Carmichael, Albert, King, & Jonas, 1971).

Os cachorros recém-nascidos são incapazes de controlar a sua temperatura e sem os cuidados adequados entram rapidamente em hipotermia. Além disso, têm por norma uma temperatura rectal de $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, inferior à dos cães adultos que geralmente está compreendida entre os 38.4°C e 39.3°C (England & Heimendahl, 2010). Nestas condições são mais suscetíveis à infeção pelo CHV-1, uma vez que este tem uma temperatura de replicação ótima entre os 35°C e 36°C . Para além desta dificuldade na regulação térmica, os neonatos não são capazes de produzir um estado de pirexia e uma resposta inflamatória capaz de reduzir a replicação viral, tornando-se naturalmente num grupo etário particularmente suscetível à infeção viral (Carmichael, Barnes, & Percy, 1969; Green, 2012; Lee et al., 2014; Lust & Carmichael, 1971). Quando a infeção ocorre em cachorros com mais de 3 semanas, geralmente sobrevivem à infeção, passando por um breve período de excreção do vírus, com sintomatologia clínica ligeira ou nula, e posterior latência (Evermann, Ledbetter, & Maes, 2011; Wright & Cornwell, 1969), embora haja registo de infeções mortais nestas idades (Brumitt, Cohn, & Essman, 2005).

1.3.3 Infeção genital em animais adultos

Ao nível genital, nos machos, o CHV-1 é capaz de produzir uma balanopostite vesicular e hiperplasia dos folículos linfóides dos bulbos penianos, ou apenas existir nos tecidos em estado de latência sem qualquer manifestação clínica. Nas fêmeas, muitas vezes o único sinal clínico é a mucosa vaginal hiperémica ou uma vulvovaginite vesicular, com hiperplasia dos folículos linfóides (Green, 2012; Hill & Maré, 1974).

A presença do vírus no linfonodo lombossagrado suporta a ideia de um local de latência a partir do qual, em momentos que permitem a recirculação do vírus no organismo, este é transportado para a mucosa genital, dando origem a novos episódios de excreção que têm um papel fundamental na contaminação dos neonatos e na transmissão venérea do vírus (Burr, Campbell, Nicolson, & Onions, 1996; Ronsse et al., 2004).

1.3.3 Infeção Respiratória

O CHV-1 é um dos vírus presentes no complexo de doenças respiratórias infecciosas, embora o seu papel ainda não esteja completamente esclarecido.

A inoculação experimental, por via intranasal, do vírus, em cães, foi capaz de produzir traqueobronquite infecciosa (Karpas, King, Garcia, Calvo, & Cross, 1968).

Durante muito tempo foi visto por alguns autores como, essencialmente, um agente secundário e oportunista, atuando concomitantemente com outros vírus, agravando o estado de saúde

destes, sendo potencialmente fatal em cachorros, mas causando sintomas ligeiros a moderados em adultos (Piewbang, Rungsipipat, Poovorawan, & Techangamsuwan, 2017). Num estudo recente (Erles, Dubovi, Brooks, & Brownlie, 2004), em cães com traqueobronquite infecciosa canina (TIC), 12,8% das amostras endotraqueais e 9,6 % das lavagens broncoalveolares continham CHV-1. O vírus foi isolado mais frequentemente a partir de animais com graves sintomas de TIC e a infeção ocorreu mais tardiamente comparativamente com outros agentes isolados no estudo. Os autores atribuem estes factos ao stress que possa ter sido provocado pela existência prévia de outros agentes que despoletaram a recrudescência do vírus ou por apenas terem contraído o vírus após entrada no canil.

Porém, a morte de quatro cães adultos, saudáveis, devido a uma broncopneumonia intersticial e rinotraqueíte aguda provocadas pelo CHV-1 levanta dúvidas sobre o seu verdadeiro impacto na infeção respiratória (Kumar et al., 2014).

A latência viral, permite que muitos animais vivam sem quaisquer sinais clínicos durante toda ou parte da sua vida. Muitos animais só manifestam doença após episódios de tratamentos com glucocorticoides (Okuda et al., 1993) ou outros fármacos imunossupressores (Malone, Ledbetter, Rassnick, Kim, & Russell, 2010), bem como o stress induzido por situações como a hospitalização (Kawakami et al., 2010), sendo que estes episódios, para além de despoletarem uma infeção ativa viral, podem ter consequências fatais.

1.4 Sinais Clínicos

1.4.1 Cachorros recém-nascidos

Cachorros infetados transplacentariamente e que nascem vivos, geralmente apresentam fraqueza e são mais pequenos que a restante ninhada. Na ninhada afetada, é possível que alguns elementos não sejam infetados por via transplacentária, contudo, aqueles que o são, podem ter contraído o vírus em diferentes momentos da gestação e geralmente morrem na primeira semana de vida (Green, 2012).

A infeção por CHV-1 em cachorros infetados após o nascimento está associada a doença sistémica, aguda e fatal, que ocorre principalmente entre os primeiros 3 dias e a terceira semana de idade. Os cachorros que eventualmente sobrevivem apresentam sequelas nervosas, como cegueira, ataxia, displasia da retina e surdez (Fontbonne, 2011; Percy et al., 1971) Aqueles que sobrevivem à forma ligeira, não sistémica, da infeção podem recuperar totalmente, embora tal seja mais comum em cachorros com mais de 2 ou 3 semanas (Carmichael, 2004).

Os cachorros com infecção sistêmica apresentam-se prostrados, deprimidos, dispneicos, anoréxicos, perdem peso corporal e a cor das fezes é amarela-esverdeada, choram insistentemente e mostram desconforto à palpação abdominal. Apesar da atividade muscular contínua associada ao choro, inquietação e tremores, os cachorros não apresentam aumento da temperatura corporal. A rinite característica do herpesvírus apresenta o exsudado seroso ou mucopurulento e raramente hemorrágico. As mucosas denotam hemorragias petequiais e as regiões inguinal e abdominal apresentam, por vezes, eritemas papulares ou vesiculares, com edema subcutâneo. A cavidade bucal, a mucosa vaginal e vulvar e a mucosa prepucial podem igualmente apresentar lesões vesiculares. Os cachorros perdem a consciência e podem ter opistótonos e convulsões pouco antes da morte. As temperaturas retais descem antes da morte, que ocorre geralmente 24 a 48 horas após o início da doença clínica (Green, 2012).

1.4.2. Cães jovens e adultos

Cachorros com mais de 3 ou 4 semanas e cães adultos, quando infetados, geralmente não aparentam qualquer sinal clínico ou apenas desenvolvem sintomatologia respiratória ou ocular ligeiras (Wright & Cornwell, 1969).

Contudo existem relatos de infecções sistêmicas fatais em cachorros mais velhos (Brumitt et al., 2005; Kapil, 2015) e num adulto imunocompetente (Gadsden, Maes, Wise, Kiupel, & Langohr, 2012), que apresentam anorexia, hipotermia, diarreia, vômito, dispneia e prostração.

Além das infecções sistêmicas estão também descritas infecções respiratórias com sinais clínicos de rinite, traqueobronquite ou broncopneumonia, como tosse seca, dispneia, corrimento nasal ou pirexia e em alguns casos essas infecções tornam-se fatais (Kumar et al., 2014), especialmente com o envolvimento de fatores imunossupressores como o stress e medicações quimioterápicas (Evermann et al., 2011; Kawakami et al., 2010).

O CHV-1 é também um agente que causa lesões genitais nos adultos. Nas fêmeas podem observar-se diversos graus de hiperémia na mucosa, lesões papulovesiculares (Hashimoto, Hirai, Fukushi, & Fujimoto, 1983), hiperplasia dos folículos linfóides e hemorragias petequiais ou submucosas (Hill & Maré, 1974). Os machos podem ter lesões semelhantes na base do pênis, com corrimento prepucial (Green, 2012).

1.4.3. Sinais clínicos oculares

O CHV-1 é um agente várias vezes isolado através da colheita de zaragatoas conjuntivais e da córnea, sendo um agente etiológico de problemas oculares (conjuntivites, queratites) em cães.

Na infecção de neonatos, a progressão da doença até ao desfecho fatal é tão rápida que muitas vezes não se valorizam os problemas oculares, embora a panuveíte associada à infecção viral intraocular seja característica nestes animais (Ledbetter, 2013). Os sinais clínicos mais comuns, apresentados por cães mais velhos, são típicos de inflamação da conjuntiva: hiperémia, quemose, corrimento ocular e blefarospasmo (Ledbetter, Hornbuckle, & Dubovi, 2009). Além destes sinais mais típicos de conjuntivite podem apresentar úlceras e hemorragias petequiais conjuntivais. A inoculação tópica ocular de CHV-1, foi capaz de produzir uma conjuntivite autolimitante e, posteriormente, a disseminação do vírus pela mesma via (Ledbetter, Dubovi, Kim, Maggs, & Bicalho, 2009). Além da conjuntivite, existem também sinais típicos de desconforto ocular como blefarospasmo, fotofobia, protusão da membrana nictitante e prurido. Nas infecções primárias os sinais são geralmente bilaterais e nas secundárias podem ser uni ou bilaterais (Ledbetter, 2013).

A administração sistémica de medicação imunossupressora (prednisolona) é uma causa da reativação do vírus que provoca a manifestação clínica de patologia ocular (Ledbetter, Kim, Dubovi, & Bicalho, 2009), algo que não acontece com muita frequência em cães imunocompetentes ou sob tratamento ocular tópico com ciclosporina, prednisolona ou radioterapia ocular (Ledbetter, da Silva, Kim, Dubovi, & Schwark, 2012; Ledbetter, Kice, Matusow, Dubovi, & Kim, 2010; Nicklin, McEntee, & Ledbetter, 2014).

Além destes sinais, o CHV-1 pode também ser responsável por queratites ulcerativas e não ulcerativas, blefarites e úlceras dendríticas da córnea (Gervais, Pirie, Ledbetter, & Pizzirani, 2012; Ledbetter, Kim, & Dubovi, 2009; Ledbetter, Riis, Kern, Haley, & Schatzberg, 2006).

1.5 Alterações *post mortem*

As necropsias de neonatos e de fetos abortados, bem como de animais adultos, revelam hemorragias e locais de necrose multifocais num parênquima descolorado de rins, fígado, baço, pulmões e glândulas adrenais. As cavidades abdominal e torácica podem apresentar fluido serosanguinolento. Os pulmões apresentam-se edemaciados, firmes e hiperémicos, com hemorragias focais com lesões histológicas compatíveis com broncopneumonia intersticial. Os intestinos e omento podem apresentar, igualmente, hemorragias petequiais ao nível das serosas e pode ser visível uma espleno e linfadenomegália generalizada devido a hiperplasia do sistema mononuclear fagocitário (Green, 2012; Kumar et al., 2014; Percy et al., 1971).

Histologicamente, os rins, um dos órgãos mais visado pela infecção apresenta lesões em cunha, de necrose fibrinóide, nas artérias interlobulares, confirmando o sistema vascular como um dos

alvos do vírus (Yamamura, Minato, Kojima, & Okaniwa, 1992). A bibliografia refere também que, histologicamente, é possível confirmar zonas de necrose focais, já observadas macroscopicamente nos órgãos referidos e também ganglioneurites, meningoencefalites granulomatosas focais não supurativas e displasias renal, cerebelar e da retina (Percy et al., 1971; Smith, 1997).

As lesões mucocutâneas vesiculares que por vezes se observam, consistem em acantólise resultante da degenerescência epitelial profunda. Os corpos de inclusão, típicos de herpesvírus, não são frequentes nas infeções por CHV-1 embora possam existir mais frequentemente no epitélio nasal ou nos rins (Green, 2012).

A nível placentar, cadelas que sofreram abortos, apresentavam zonas de necrose multifocal, com corpos de inclusão nas células endoteliais do trofoblasto e vasculite nos vasos sanguíneos alantóicos (Hashimoto et al., 1979, 1982).

1.6 Diagnóstico

A anamnese (historial de problemas reprodutivos ou de traqueobronquite infecciosa), os sinais clínicos (lesões genitais vesiculares, conjuntivites, problemas respiratórios) o exame *post mortem* e as alterações presentes nos resultados de exames complementares como o hemograma (presença de trombocitopenia), podem, em conjunto, indicar um diagnóstico presuntivo de infeção por herpesvírus canino, no entanto os sinais e lesões que este inflige são muitas vezes pouco específicos, pelo que o recurso a técnicas de biologia molecular e serologia é fundamental para um diagnóstico definitivo.

1.6.1. Diagnósticos diferenciais

Os animais adultos com CHV-1 exibem, geralmente, sinais clínicos oculares e respiratórios ligeiros, pelo que a elaboração de diagnósticos diferenciais com posterior confirmação do agente etiológico é muitas vezes descartada e opta-se simplesmente pelo tratamento sintomático. No entanto, como causa de problemas reprodutivos, nomeadamente abortos, e de mortalidade neonatal o CHV-1 é um agente frequentemente equacionado (Larsen, Kiupel, Balzer, & Agerholm, 2015). Os diagnósticos diferenciais para estes problemas incluem causas infecciosas e não infecciosas (Tabela 2).

Tabela 2 – Diagnósticos diferenciais de abortos e mortalidade neonatal (Poulet, 2005)

	<i>Abortos</i>	<i>Mortalidade Neonatal</i>
<i>Causas Não Infeciosas</i>	Stress Trauma Insuficiência do corpo lúteo Tóxicos Iatrogénico Défices nutricionais	Malformações congénitas Traumas Intoxicação Síndrome do leite tóxico Traumatismo Intoxicação
<i>Causas Infeciosas</i>	<i>Brucella canis</i> <i>Mycoplasma canis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> Infecções bacterianas inespecíficas Parvovirus canino Herpesvirus canino <i>Toxoplasma gondii</i> <i>Neosporum caninum</i> Parasitas	<i>Mycoplasma canis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> Infecções bacterianas inespecíficas Parvovirus canino Herpesvirus canino <i>Toxoplasma gondii</i> Esgana

1.6.2 Isolamento viral

O isolamento viral é feito, no *post mortem*, a partir de vários órgãos de animais infetados, principalmente de rim, glândulas adrenais, pulmão, baço, fígado ou linfonodos e em animais vivos são colhidas zaragatoas conjuntivais, nasais, genitais e do trato respiratório.

O crescimento do CHV-1 é bastante sensível à temperatura, sendo o seu crescimento ótimo entre 35°C e 36°C, em células MDCK oriundas de culturas primárias de células epiteliais renais (Carmichael & Medic, 1978).

O CHV-1 é um vírus lítico e a morfologia das placas de lise pode ser utilizada para avaliar a virulência de diferentes estirpes do vírus, embora, no geral, a formação de placas seja bastante idêntica, com as células infetadas a tornarem-se arredondadas e com um núcleo aumentado. Estas separam-se do tapete celular, deixando placas claras rodeadas por células necróticas. A formação das placas é mais visível por sobreposição da cultura celular por meios semissólidos, tais como ágar ou a metilcelulose (Carmichael & Medic, 1978; Green, 2012).

Não sendo o isolamento viral o método mais sensível para a deteção do vírus (Burr et al., 1996), é possível fazê-lo até 2 a 3 semanas pós-infecção, uma vez que o vírus fica rapidamente latente nos tecidos, não existindo uma excreção ativa e, a não ser em casos em que se promoveu a

reativação do vírus pela administração de glucocorticoides, é difícil a detecção deste posteriormente a esse período (Green, 2012; Ledbetter et al., 2009).

A confirmação do isolamento viral em cultura de células pode ser efetuada através de microscopia eletrônica, imunofluorescência e PCR (polymerase chain reaction).

1.6.3 Serologia

As técnicas utilizadas para detecção de anticorpos contra o herpesvírus canino são ELISA (Ronsse et al., 2005; Takumi et al., 1990), imunofluorescência direta (Sonne, 2009) e indireta (Góngora et al., 2007), teste da imunoperoxidase (IPMA) (Krogenæs et al., 2012; Krogenæs et al., 2014), inibição da hemaglutinação (Nemoto et al., 1990) e seroneutralização viral com e sem adição de complemento (Ronsse et al., 2002).

A existência de vários testes serológicos, pode explicar, em parte a diferença de prevalências encontrada. Segundo Ronsse et al. (2005) a testagem através de ELISA é a mais sensível e se realizada de forma seriada nos mesmos animais, ao invés de uma única vez, pode levar a resultados mais fidedignos, permitindo a detecção de alterações serológicas mais subtis.

A detecção de anticorpos nem sempre significa que haja doença, apenas indica que houve um contacto com o vírus. Em animais saudáveis a presença de anticorpos indica que este estará, provavelmente, latente nos tecidos. Os anticorpos neutralizantes aumentam após a infecção e podem permanecer elevados durante 1 a 2 meses, no entanto, títulos baixos podem vir a ser detetados durante 2 anos (Green, 2012).

1.6.4 Diagnóstico molecular por PCR

O PCR apresenta-se como a mais sensível das técnicas de diagnóstico molecular (Evermann et al., 2011). Permite detetar o vírus mesmo em estados de latência e demonstrando a sua presença em linfonodos e nos diferentes órgãos do organismo (Burr et al., 1996; Miyoshi et al., 1999).

Alguns estudos associaram o PCR com Southern blotting (Miyoshi et al., 1999) e hibridação *in situ* (Schulze & Baumgärtner, 1998) para otimização de resultados. De todas as modalidades de PCR o RTq-PCR utilizado por Decaro et al. (2010), com possibilidade de quantificação viral, é, até ao momento, o que apresenta maior sensibilidade.

A propósito do envolvimento do CHV-1 na traqueobronquite infecciosa canina, foi também desenvolvido um PCR multiplex permite a detecção de múltiplos agentes virais respiratórios em simultâneo, o que permitirá otimizar tratamentos e medidas de prevenção (Piewbang, Rungsipipat, Poovorawan, & Techangamsuwan, 2016).

Os resultados negativos dos PCR feitos pelas colheitas de zaragatoas devem, no entanto, ser avaliados de forma crítica uma vez que em animais sem lesões, com vírus em latência ou já imunizados a excreção viral pode ser muito curta (Ronsse et al., 2005).

1.7 Tratamento

O tratamento das infecções de CHV-1 é muitas vezes ineficaz e, especialmente em cachorros neonatos, pouco profícuo, uma vez que os cachorros que conseguem sobreviver às infecções sistêmicas revelam sintomatologia neurológica grave que culmina em eutanásia. A mortalidade nas ninhadas pode ser reduzida pela inoculação intraperitoneal, nos cachorros, de soro hiperimune, obtido do soro de cadelas que recentemente tenham gerado ninhadas infetadas. O sucesso desta terapêutica depende da concentração de anticorpos presentes no soro e da precocidade com que é aplicada, uma vez que uma vez manifestados os sintomas neurológicos, a hipótese de recuperação é diminuta (Green, 2012).

Na maioria das vezes é feito apenas uma terapia de suporte com aumento da temperatura ambiente e fluidoterapia.

In vitro, o aumento da temperatura provoca uma diminuição substancial na replicação viral (Lust & Carmichael, 1971). *In vivo*, sabe-se que os cachorros hipotérmicos são mais suscetíveis e, embora o aumento da temperatura envolvente não diminua a mortalidade dos cachorros já infetados. O aumento da temperatura corporal dos cachorros, artificialmente, previamente à exposição ao vírus, diminui a mortalidade e morbidade destes (Carmichael et al., 1969; Green, 2012).

O tratamento da infecção sistêmica por CHV-1 com medicamentos antivirais, como 5-iodo-2-desoxiuridina, não foi bem-sucedido. No entanto, num estudo, após a morte de dois cachorros com 15 dias de idade infetados por CHV-1, cinco cachorros da mesma ninhada foram tratados com vidarabina, assim que a causa das mortes foi identificada e os cinco sobreviveram. Os cachorros sobreviventes tinham títulos de anticorpos neutralizantes elevados, 2 meses mais tarde, indicando que tinham sido infetados. A administração oral de 10mg de aciclovir, de 6 em 6 horas, numa ninhada de cachorros até terem 3 semanas e meia de idade também revelou sucesso, embora ainda não tenham sido determinadas as doses terapêuticas exatas para o CHV-1 (Evermann et al., 2011; Green, 2012).

A lactoferrina demonstrou, *in vitro*, atividade antivírica contra o CHV (Tanaka et al., 2003), mas o mesmo não foi conseguido *in vivo* (Evermann et al., 2011).

As infecções respiratórias e genitais são alvo de tratamento sintomático, com recurso a antibióticos quando de infecções bacterianas concomitantes. Já nas infecções oculares, para além da utilização de antimicrobianos tópicos para prevenção destas mesmas infecções e de atropina tópica como midriático, foi possível realizar, com sucesso, tratamento antiviral composto por uma solução oftálmica de 0,1% de idoxuridina ou de trifluridina a 1% (Spertus, Mohammed, & Ledbetter, 2016). A Idoxuridina e a trifluridina são análogos de nucleótidos, são bons anti-herpéticos e são bem tolerados pelos cães quando aplicados topicamente como formulações oculares. Ambos os antivirais são administrados 6 a 8 vezes por dia durante as primeiras 48 horas e depois 4 vezes ao dia até à resolução dos sinais clínicos oculares. A solução oftálmica de cidofovir 0,5% é um antiviral oftálmico alternativo para doença ocular de CHV que é eficaz, com administração duas vezes por dia (Evermann et al., 2011).

1.8 Prevenção

A dificuldade de detetar, *in vivo*, animais com apresentações subclínicas da infeção viral, bem como as particularidades nos padrões serológicos e virológicos, encarecem o diagnóstico. No entanto, a vacinação e imunoterapia, com um conjunto de boas práticas quando da criação, podem contribuir substancialmente para redução da prevalência do vírus.

1.8.1 Boas práticas de criação

A higiene é um dos pontos essenciais de um bom canil de criação, não só no que diz respeito a este vírus, mas como para todas as doenças infecciosas, sendo um pilar na manutenção e promoção do estado hígido de todos os indivíduos. O CHV-1, dadas as suas características, é facilmente inativado pelos desinfetantes comuns, pelo que a limpeza regular ajudará na diminuição da propagação do vírus (Green, 2012; Ronsse et al., 2004). O ser humano, não sendo hospedeiro do vírus, pode atuar como fomite, pelo que é importante a assepsia, especialmente quando se lida com animais recém-nascidos (Evermann et al., 2011).

Também o número de animais por canil é importante. Uma maior densidade de animais por canil aumenta o risco de infeção por herpesvírus canino e, sempre que possível, esta deve ser reduzida (Ronsse et al., 2004).

Deve evitar-se o contacto entre neonatos e animais adultos que apresentem sinais de doença ocular, respiratória ou genital (conjuntivites, rinites, vulvovaginites, etc.), uma vez que podem ser sinais de disseminação ativa de CHV-1 (Green, 2012).

Para os neonatos é importante garantir que a temperatura ambiente é adequada, para que estes não sejam tão vulneráveis à infeção (Carmichael et al., 1969). Deve utilizar-se dispositivos de

aquecimento, como lâmpadas de calor, tendo o cuidado de não provocar desidratação (Green, 2012).

A introdução de novos animais pode ser um fator que despoleta a reativação do vírus (Ronsse et al., 2004), pelo que deve isolar-se as fêmeas reprodutoras nas semanas imediatamente antes e depois dos nascimentos dos cachorros (Fontbonne, 2011).

O recurso à inseminação artificial como medida preventiva é controverso, embora, teoricamente possa diminuir o risco de contaminação. A realização de cesarianas eletivas é desnecessária como medida preventiva, uma vez que estas não impedem a transmissão intrauterina, no decurso da gestação, nem impedem a contaminação por via oronasal, após o nascimento (Fontbonne, 2011).

1.8.1 Vacinação e imunoterapia

A melhor forma de proteger os neonatos é através da imunização passiva com colostro, após imunização ativa das fêmeas. A utilização de vacinas vivas, ainda que atenuadas, está contraindicado pela possibilidade do vírus ficar latente nos tecidos (Green, 2012). A utilização de uma vacina composta por gB da estirpe F205, liofilizada e inativada, mostrou eficácia, com nenhum cachorro vacinado a demonstrar sinais clínicos e 93,5 % a evitar a infeção viral, enquanto que 81% dos cachorros não vacinados morreram devido à infeção por CHV-1. A vacina é atualmente comercializada na Europa (EURICANHerpes205, Merial, Lyons, France), com o seguinte esquema vacinal: A primeira injeção é feita durante o estro ou 7 a 10 dias após a presumível data de acasalamento; A segunda injeção é dada 1 a 2 semanas antes da presumível data do parto (Poulet et al., 2001).

Outra forma de imunização é a inoculação de soro imune, já mencionada, quando não é possível a ingestão de colostro rico em anticorpos anti-CHV-1. Outro tratamento, ao qual falta validação científica adicional, é a administração de um poxvírus aviário, a cadelas e cachorros, para induzir a ativação do complemento e produzir uma proteção não-específica contra o vírus (Green, 2012).

Está patenteada uma manga vaginal que impede os cachorros de contrair CHV-1 por contato com a parede vaginal da mãe durante o nascimento. A manga é inserida na vagina da fêmea gestante, antes do parto, e ao atravessarem o canal de parto, através da manga, sem entrarem em contato direto com o tecido vaginal, os cachorros evitam a infeção (US20160051663 A1, 2016).

A fraca virulência e alta especificidade do CHV-1 torna-o um bom vetor para vacinas contra outros agentes que atingem canídeos domésticos e selvagens (Reubel, Wright, Pekin, French,

& Strive, 2006; Strive, Hardy, Wright, & Reubel, 2007). Após manipulação genética, o CHV-1 já foi utilizado como vacina recombinante contra o vírus da pseudorraiva, o vírus da raiva e contra *Neospora caninum* (Nishikawa et al., 2000; Nishikawa, Xuan, Kimura, & Otsuka, 1999; Xuan et al., 1998).

Capítulo II – Análise molecular e serológica de CHV-1 em canídeos de canis da Região de Lisboa e Vale do Tejo e do Distrito de Coimbra

1. Objetivos

O herpesvírus canino é um agente há muito identificado e descrito (Carmichael, Squire, & Krook, 1965), mas até à data não existem muitos estudos sobre a sua prevalência em Portugal, embora em 2014 uma estudo português tenha detetado um seroprevalência de 65% (Costa, Mateus, Duarte, Tavares, & Fabrica, 2014). Embora, clinicamente, não assuma muita relevância, uma vez que a sintomatologia em animais adultos é geralmente ligeira ou inexistente, é comum ser uma das principais suspeitas em casos de infertilidade, aborto e morte de ninhadas com poucos dias de vida (Green, 2012).

Este estudo teve como objetivo a deteção e quantificação do Herpesvírus Canino através de *qPCR*, numa população de cadelas em Portugal, nos distritos de Lisboa e Coimbra, e a deteção e quantificação de anticorpos contra este vírus através de Imunofluorescência Indireta de modo a que fosse possível avaliar a frequência do vírus em canis nacionais. Foi largamente privilegiada a recolha de amostras de cadelas de criação, uma vez que, embora a vacina e outros cuidados médicos sejam destinados a todas as cadelas gestantes, são geralmente os criadores os tutores que mais investem na proteção das suas cadelas e respetivas ninhadas, dando assim a este estudo alguma relevância clínica pela capacidade que tem em fornecer aos criadores informação sobre a existência de um agente infeccioso nos seus canis.

Com este estudo pretendemos também perceber o impacto que as vacinações, ou a sua inexistência, têm tido nestes animais e a necessidade de se reforçar ou não a aposta na profilaxia vacinal, bem como a associação que possa existir entre a dimensão do canil (nº de animais), número de gestações, idade, historial de problemas reprodutivos, presença de TIC no efetivo e fase do ciclo éstrico e a infeção por CHV-1.

2. Material e Métodos

2.1 Caracterização da amostra

A amostra foi composta por 49 cadelas, provenientes de 10 canis de criadores nacionais e de 2 associações de animais (Tabela 3).

Ao exame físico, todas as cadelas se apresentavam saudáveis e nenhuma exibia lesões ou sinais clínicos que pudessem sugerir infeção pelo herpesvírus canino.

As amostras de 20 cadelas foram colhidas na sequência de consultas de reprodução prestadas pela secção de Reprodução e Obstetrícia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade de Lisboa e as restantes 29 amostras foram colhidas na sequência de deslocações domiciliárias, efetuadas para este estudo. Foram escolhidas cadelas que se apresentassem em estro (confirmado por citologia vaginal), à exceção de 21 cadelas provenientes do criador

número 10, que se encontravam em anestro. Só foram colhidas amostras de cadelas que tivessem sido vacinadas contra o herpesvírus canino, há 6 meses ou mais.

Todos os tutores responderam a um questionário que pretendia obter informações mais detalhadas em relação às cadelas, ao historial médico destas e às condições do canil onde se encontravam (Anexo 1).

Tabela 3 – Número de canis e de animais por canil

Canil	Nº de animais por canil
Criador nº1	1
Criador nº2	3
Criador nº3	3
Criador nº4	1
Criador nº5	1
Criador nº6	1
Criador nº7	1
Criador nº8	1
Criador nº9	9
Criador nº10	25
Associação nº1	2
Associação nº2	1
12 Canis	49 Animais

2.2 Colheita e conservação das amostras

Em cada uma das 49 cadelas, foram efetuadas três colheitas por zaragatoa (uma vaginal, uma nasal e uma ocular) para pesquisa de ADN viral nas secreções vaginais, nasais e oculares. As zaragatoas foram mantidas a 4°C até ao seu processamento.

Foi também realizada a colheita de uma amostra sanguínea em todos os animais, para posterior obtenção de soro, para pesquisa de Imunoglobulinas G e M (IgG e IgM) por imunofluorescência indireta. Foi colhido cerca de 1mL de sangue para um microtubo de 2mL, a partir das veias jugulares ou cefálicas, que foi mantido a 4°C até ao seu processamento. O soro foi recolhido para um eppendorf de 2 mL, após centrifugação a 2000 Xg durante 5 minutos e mantido a -80°C até realização da análise serológica.

2.3 Métodos de Diagnóstico

2.3.1 Realização de qPCR

Extração e Quantificação do ADN

A extração de ADN viral presente nas zaragatoas nasais, oculares e vaginais foi realizada através da utilização de um *kit* comercial (*DNeasy® Blood & Tissue - Qiagen®*) de acordo com as instruções do fabricante.

As zaragatoas foram homogeneizadas numa solução de 250µL de PBS, à qual foram posteriormente adicionados 20µL de protease e 200µL de tampão desnaturante (tampão AL), com posterior incubação da solução a 56°C durante 15min.

Após estes passos, foram adicionados 200µL de etanol a 100% para precipitação dos ácidos nucleicos e o lisado foi colocado numa coluna de sílica (*DNeasy Mini spin column*) para fixação seletiva e de alta afinidade do ADN desidratado. Foram posteriormente realizadas lavagens e centrifugações sucessivas com os tampões fornecidos no *kit* (500µL de tampão AW1 e 500µL de tampão AW2) e o ADN fixo na coluna foi eluído para um tubo identificado, com 60 µL de tampão AE (tampão de eluição hidratante).

Após extração do ADN, foi efetuada a sua quantificação no espectrofotómetro *Nanodrop 2000c Spectrophotometer®* (*Thermo Fisher Scientific*) e as amostras armazenadas a -80°C até realização do *qPCR*.

Deteção e Quantificação da carga viral

A deteção e quantificação da carga viral (em moléculas/µL) foram realizadas através da técnica de *qPCR*. Neste trabalho recorreu-se à tecnologia *TaqMan®* da *Applied Biosystems* que inclui para além de um par de *primers* ou iniciadores específicos, um terceiro *primer* (sonda)

específico e marcado com um fluoróforo (*reporter*) na extremidade 5'' e um *quencher* na extremidade 3''. Enquanto não ocorre ligação da sonda à região correspondente do ADN (delimitada pelos *primers forward* e *reverse*), o *reporter* e o *quencher* mantêm-se próximos e o *quencher* inibe a emissão de fluorescência pelo *reporter*. Após a ligação da sonda e dos *primers* à sequência alvo, a atividade da exonuclease 5''-3'' da Taq polimerase hidrolisa a sonda, induzindo o consequente afastamento entre o *reporter* e o *quencher*, levando à emissão de fluorescência. A intensidade da fluorescência emitida no final de cada ciclo é proporcional à quantidade de produto final amplificado, sendo apresentada num gráfico que permite monitorizar, em tempo real, a cinética da reação de amplificação. Se a sequência alvo não estiver presente, não há ligação da sonda e, consequentemente, não ocorre emissão de fluorescência (VanGuilder, Vrana, & Freeman, 2008).

Os primers e sonda utilizados foram os descritos por Decaro et al. (2010) (Tabela 4) tendo como alvo o gene codificante da glicoproteína B do involucro viral. As reações foram efetuadas no volume final de 20µl, com 10 µL de SensiFAST™ Probe Mix (Bioline), 0,3µM de *primer forward* e *reverse*, 0,25 µM de sonda e 50ng de ADN total.

As reações de qPCR foram realizadas num termociclador (Real-time 7300 – Applied Biosystems) e submetidas a 95°C durante 10 min para desnaturação do ADN, e ativação da Taq polimerase, seguida de 40 ciclos a 90°C/15 segundos e 60°C/1 min.

Tabela 4 – Primers e sonda utilizados no qPCR para amplificação da sequência de CHV-1 e localização e dimensão do fragmento (Decaro et al., 2010)

<i>Primers e sonda</i>	Sequência de 3'' para 5''	Tamanho do Fragmento
<i>Primer forward</i>	ACAGAGTTGATTGATAGAAGAGGTATG	136pb
<i>Primer reverse</i>	CTGGTGTATTAACTTTGAAGGCTTTA	
Sonda	FAM- TCTCTGGGGTCTTCATCCTTATCAAATGCG- TAMRA	

Como controlo positivo, foi utilizado um recombinante plasmídico com o produto de amplificação clonado disponível no laboratório de Virologia, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

As provas apenas foram validadas quando se obteve amplificação dos controlos positivos (*standard*) e quando não se observou amplificação nos controlos negativos, indicativa de contaminação (Figura 3).

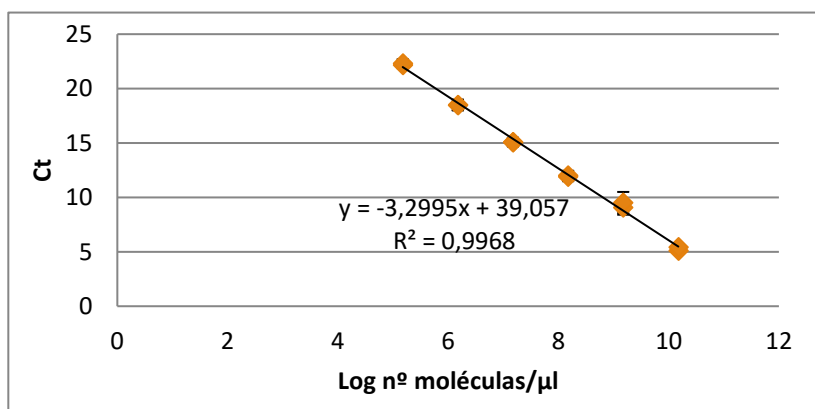
Figura 3 – Curvas de amplificação dos controlos negativos e do controlo positivo (standard) (original).



Com base na fórmula:

Número de cópias-alvo (moléculas/ μ l) = [concentração em g/ μ l / (número de pares de bases x peso molecular médio de um par de bases)] x número de Avogadro, a massa do controlo positivo foi convertida em nº de moléculas por unidade de volume. De seguida, para determinação da carga viral com o qPCR, foram efetuadas 6 diluições seriadas de base 10 (10^{-1} a 10^{-6}) do controlo positivo, de forma a estabelecer uma reta padrão (Figura 4). O sistema revelou uma eficiência de 100% e uma sensibilidade superior a 15 cópias.

Figura 4 – Reta de calibração para o CHV-1 (Original)



A construção da curva standard (Figura 5) foi efetuada com base no valor de ct de cada diluição do controlo positivo. O Ct para cada amostra foi determinado como o número do ciclo no qual a fluorescência emitida ultrapassava o limite de deteção, aferido pelo aparelho.

Figura 5 – Curvas standard da amplificação de diferentes diluições do controlo positivo (standard) (original)

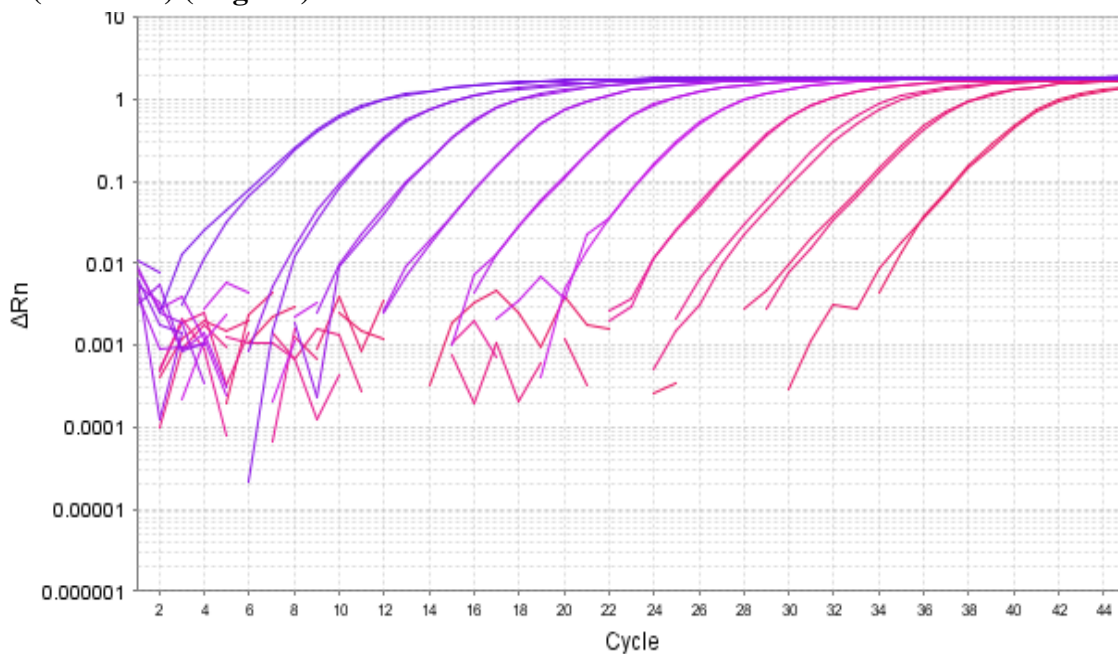


Tabela 5 – Número de moléculas presentes em cada diluição

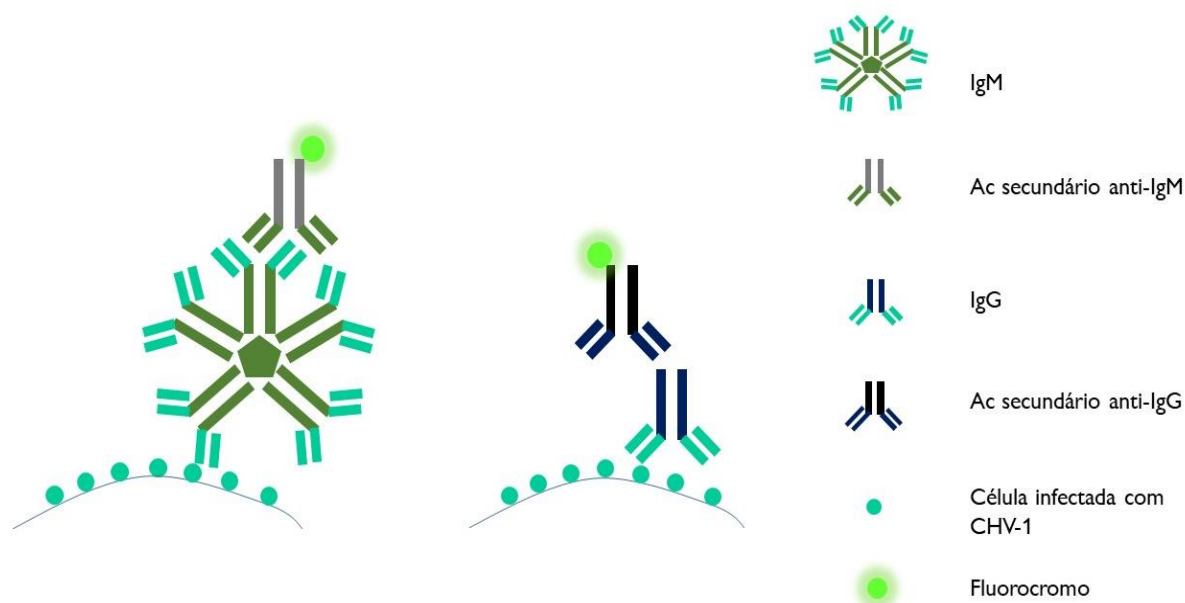
Diluições	Nº de moléculas	Log (10)
10^{-1}	$1,5 \times 10^{10}$	10,17
10^{-2}	$1,5 \times 10^9$	9,17
10^{-3}	$1,5 \times 10^8$	8,17
10^{-4}	$1,5 \times 10^7$	7,17
10^{-5}	$1,5 \times 10^6$	6,17
10^{-6}	$1,5 \times 10^5$	5,17

2.3.2 Serologia

A detecção de anticorpos anti-CHV-1 presentes nas amostras de soro, foi realizada pela DNAtect, através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Esta técnica de IFI consiste na utilização de uma lâmina que contém fixadas células infectadas com CHV1, à qual se adicionam diluições dos soros que se pretende testar. Se nos soros testados houver anticorpos anti-CHV-1, estes ligar-se-ão especificamente ao antígeno. A estes anticorpos damos o nome de anticorpos primários (Ac primários). Posteriormente são adicionados os segundos anticorpos (Ac secundários) marcados com um fluorocromo e que são anticorpos anti-Ac primários, que irão ligar-se à região Fc destes. A fluorescência emitida pelo fluorocromo presente nesta cadeia de ligações é observada num microscópio de fluorescência (Figura 6).

O critério de positividade das amostras corresponde à observação de fluorescência específica nas diluições do soro problema superiores a 1:20. Para além dos resultados em titulações de 1:20, foram apresentados também os resultados em titulações de 1:100, permitindo uma avaliação quantitativa do grau de positividade das amostras. A prova foi realizada para a detecção de IgGs e IgMs específicas permitindo uma avaliação da precocidade da infeção.

Figura 6 – Esquema representativo do princípio de Imunofluorescência Indireta utilizada no estudo, ilustrando a detecção de IgG e IgM (original)



2.4 Análise estatística

Os resultados das análises serológicas e moleculares para detecção de infeção por CHV-1, foram sujeitos a uma análise estatística, efetuada com recurso a 3 programas. A organização dos dados foi efetuada no Microsoft® Excel® 2016. A análise estatística foi realizada no programa de

estatística Rcommander®, com a extensão Rcmdr. A ferramenta EpiTools (AusVet Animal Health Services®) foi utilizada para calcular o intervalo de confiança da proporção de positivos à infecção por CHV-1.

A existência de associação entre as variáveis testadas (idade, nº de gestações, dimensão do canil, estatuto vacinal, ciclo éstrico, presença de traqueobronquite infecciosa canina (TIC) no efetivo e existência de problemas reprodutivos) e a presença de infecção por CHV-1 foi analisada através de tabelas de contingência e da realização do Teste de Fisher. Os resultados dos testes foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p (significância) foi menor que 0,05, com um intervalo de confiança de 95%.

Os resultados das variáveis quantitativas são apresentados como média \pm desvio-padrão da média.

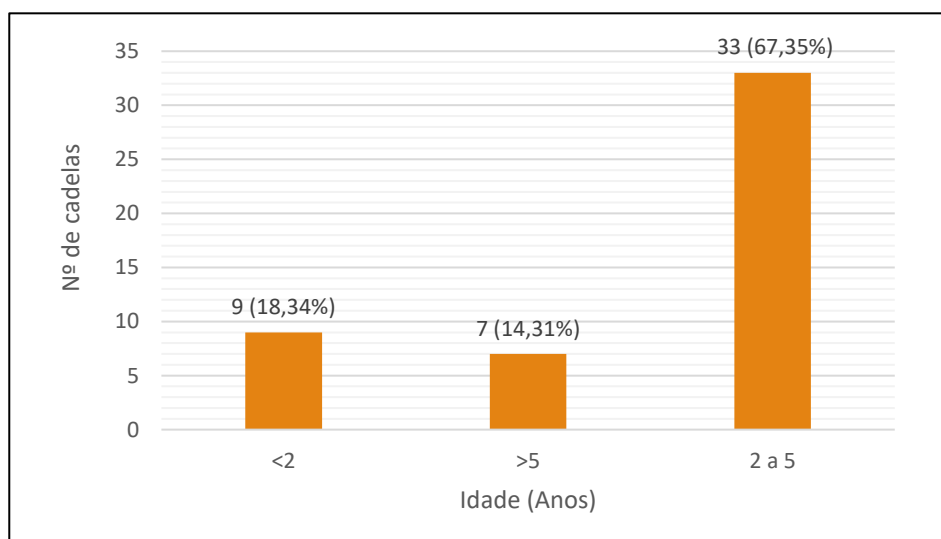
3. Resultados

3.1. Caracterização, através dos dados obtidos nos questionários, da amostra populacional estudada

3.1.1 Caracterização por idade

Na amostra de 49 cadelas verificou-se uma média de idades de 3.41 ± 2.11 anos. O animal mais velho tinha 7 anos e o mais novo 7 meses, com uma distribuição de 18,34% na classe < 2 anos, 67,35% na classe dos 2 aos 5 anos, e 14,31% na classe > 5 anos (Gráfico1).

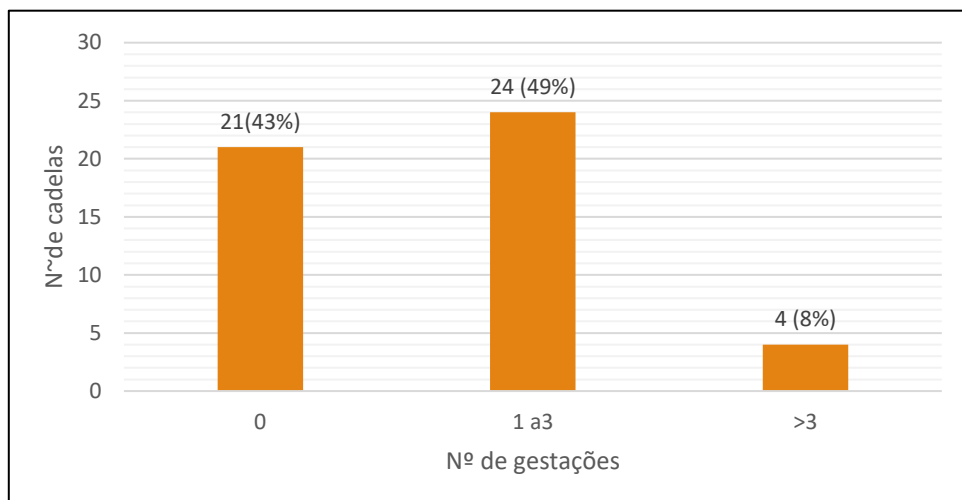
Gráfico 1 – Distribuição da amostra por idades



3.1.2 Caracterização por nº de gestações

Na amostra estudada a média de gestações foi de 1.24 ± 1.64 , sendo que 21 (43%) cadelas eram cadelas nulíparas e apenas 4 (8%) cadelas já tinham tido mais de 3 gestações (Gráfico 2).

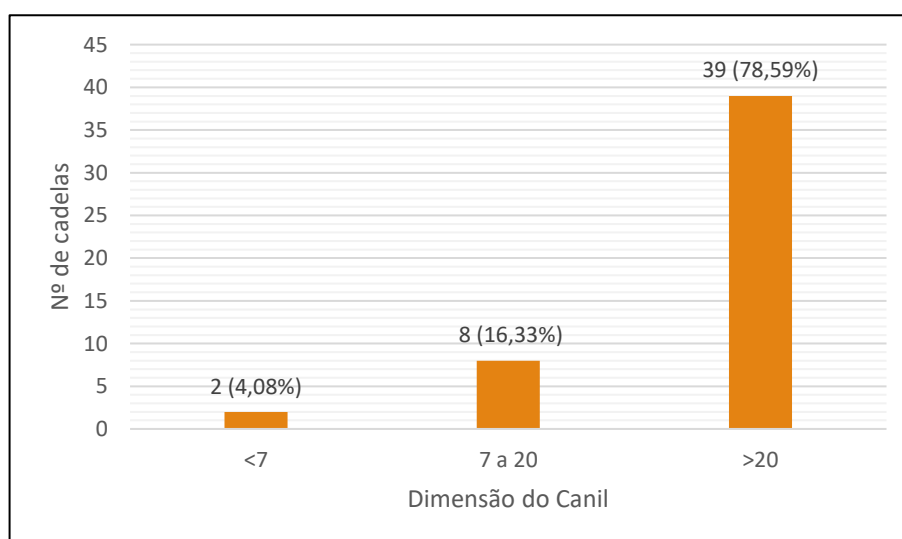
Gráfico 2 – Distribuição da amostra por nº de gestações de cada cadela



3.1.3 Caracterização por dimensão do canil

No que diz respeito à dimensão do canil, a amostra foi dividida em três classes: canis com menos de 7 animais, canis com 7 a 20 animais e canis com mais de 20 animais. A grande maioria das cadelas (79,59 %) presentes neste estudo vivia em canis cujos efetivos ultrapassavam os 20 cães por canil e apenas 2 viviam em canis com menos de 7 (4,08%) animais (Gráfico 3).

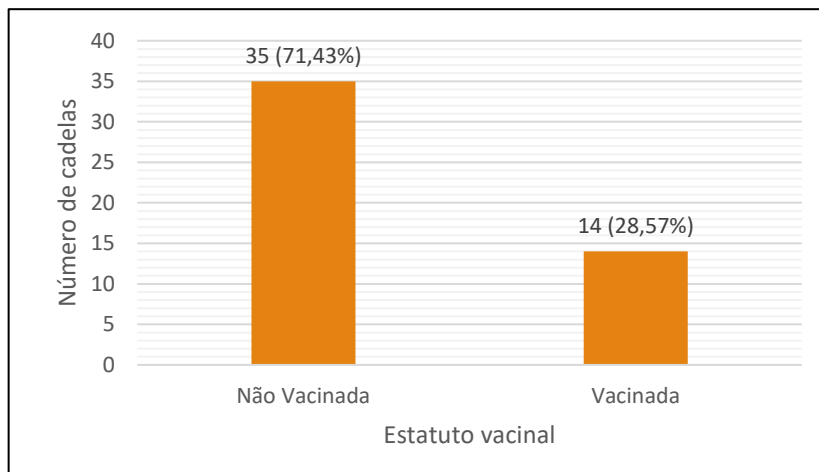
Gráfico 3 – Distribuição da amostra pela dimensão do canil que habitam



3.1.4 Caracterização por estatuto vacinal

Das 49 cadelas presentes neste estudo 71,43% (35/49) nunca havia sido vacinada contra o CHV-1. As restantes (14/49; 28,57%) foram vacinadas em anteriores gestações, de acordo com o esquema vacinal recomendado (Gráfico 4).

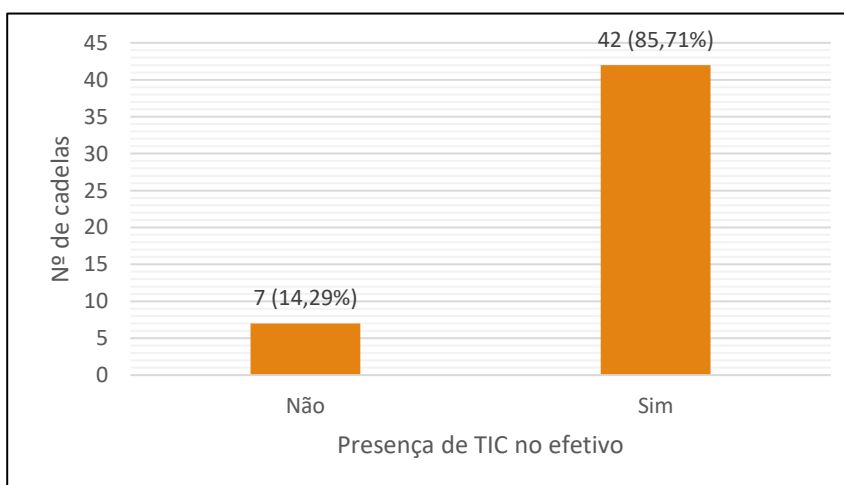
Gráfico 4 – Distribuição da amostra por estatuto vacinal de cada cadela



3.1.5 Caracterização por presença de traqueobronquite infecciosa no efetivo

Na amostra em estudo, 85,71% das cadelas (42/49) eram provenientes de efetivos com um historial de suspeita de episódios de traqueobronquite infecciosa (TIC). As restantes cadelas eram provenientes de efetivos que nunca tinham sido afetados por esta doença (Gráfico 5).

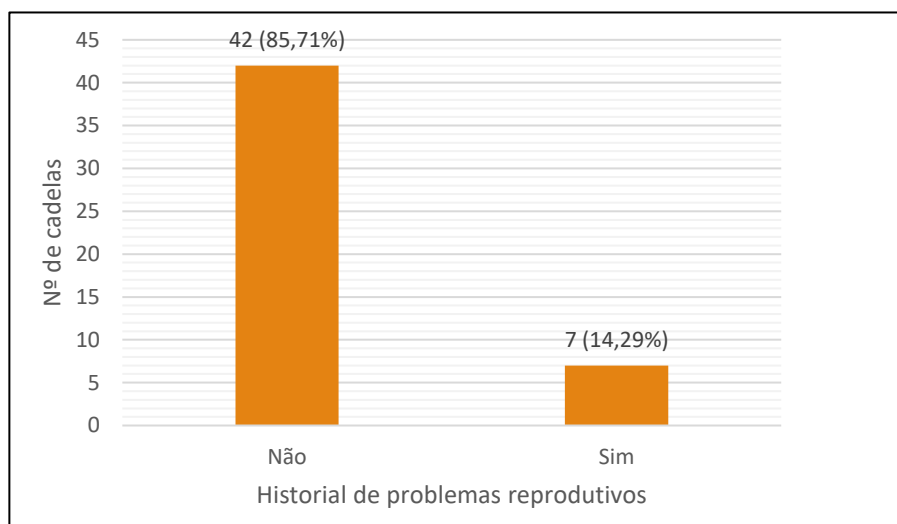
Gráfico 5 – Distribuição da amostra por presença de TIC no efetivo



3.1.6 Caracterização por cadelas com problemas reprodutivos

Das 49 cadelas, 85,71% (42/49) nunca apresentaram problemas reprodutivos. As restantes apresentaram problemas reprodutivos (abortos, nados-mortos e cachorros mortos nas primeiras semanas) de etiologia desconhecido (Gráfico 6).

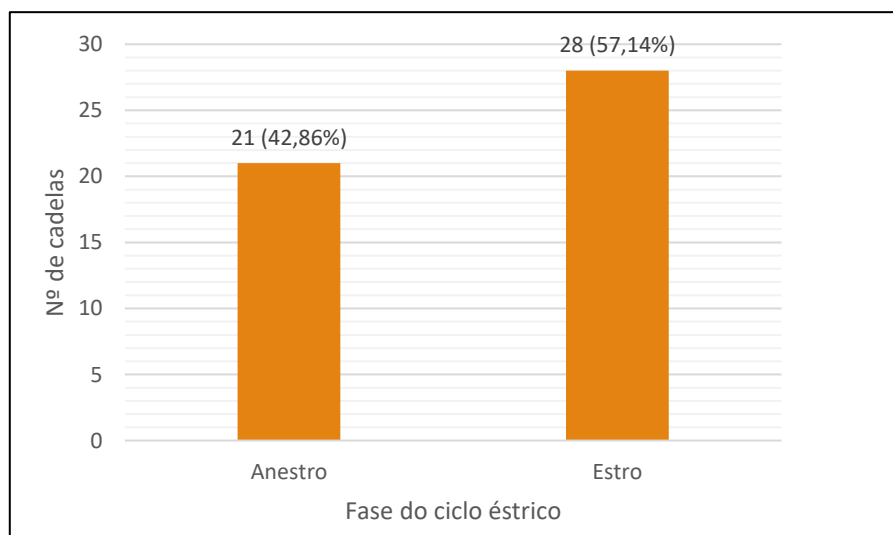
Gráfico 6 – Distribuição da amostra por historial de problemas reprodutivos



3.1.7 Caracterização por ciclo éstrico

Na presente amostra só foram identificados animais em duas fases do ciclo éstrico. 21 cadelas (42,86%) encontravam-se em anestro e as restantes 28 (57,14%) encontravam-se em estro, confirmado por citologia vaginal.

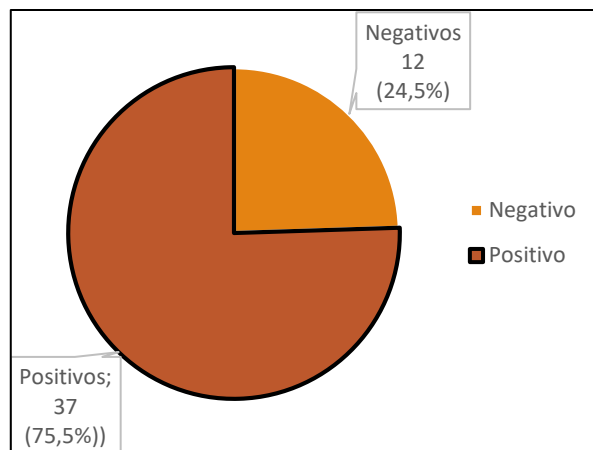
Gráfico 7 – Distribuição da amostra por fase do ciclo éstrico



3.2 Resultados obtidos na Imunofluorescência Indireta

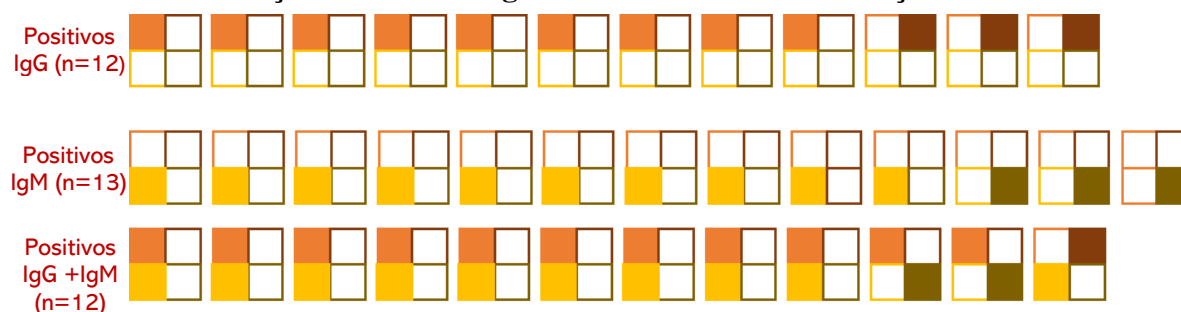
Os soros das 49 cadelas testadas apresentaram uma proporção de positivos de 75,5%, IC 95% [61,9%; 81,4%] (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Proporção de animais positivos e negativos na análise por imunofluorescência indireta



Dos positivos, 32,45% (12/37) foram positivos a IgG, 35,1% (13/37) foram positivos a IgM e 32,45% (12/37) foram positivos a IgG e IgM. Dos positivos a IgG, 75% (9/12) dos animais eram positivos na titulação 1:20 e 25% (3/12) na titulação 1:100. Dos positivos a IgM 76,9% (10/13) dos animais foram positivos na titulação de 1:20 e 23,1% (3/13) eram positivos na titulação de 1:100. Dos positivos a ambas as imunoglobulinas 75% (9/12) eram positivos a ambas as Ig na titulação de 1:20, 16,7% (2/12) eram positivos a IgG na titulação de 1:20 e simultaneamente positivos a IgM na titulação de 1:100 e os restantes 8,3% (1/12) positivos a IgG na titulação de 1:100 e simultaneamente positivos a IgM na titulação de 1:20 (Figura 7).

Figura 7 – Representação gráfica dos resultados da imunofluorescência indireta e das diferentes combinações entre imunoglobulinas e as suas combinações



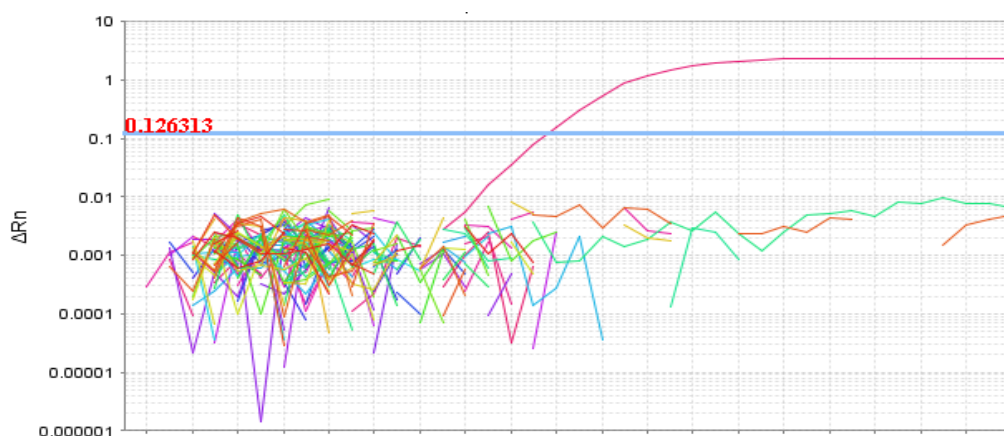
Legenda

IgG 1:20	IgG 1:100
IgM 1:20	IgM 1:100

3.3 Resultados do qPCR

As 147 amostras recolhidas e analisadas por qPCR foram negativas a ácido nucleico viral, não revelando a presença de CHV-1 nas secreções vaginais, nasais e oculares (Figura 8) de nenhuma das cadelas testadas. No Anexo III são apresentados os resultados da quantificação e pureza do ADN, calculados no espectrofotómetro *Nanodrop 2000c Spectrophotometer*®.

Figura 8 – Curvas de amplificação de amostras negativas e dos controlos negativos e positivo (standard) (original)



3.4 Resultados da análise estatística efetuada

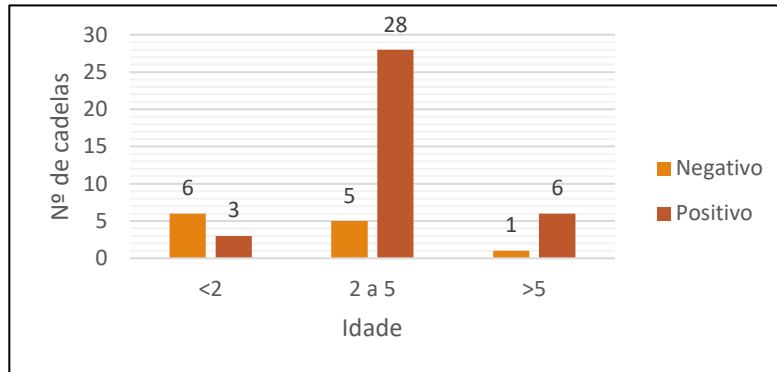
As variáveis ou fatores de risco sujeitas a análise estatística, foram a idade, o nº de gestações de cada cadela, a dimensão do canil, o estatuto vacinal, a fase do ciclo éstrico, presença de TIC no efetivo e existência de problemas reprodutivos, de forma a avaliar a existência de associação entre estas variáveis e a infeção por CHV-1, detetada na IFI. Os resultados estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores de p obtidos para cada variável, calculados através do Teste Exato de Fischer

Variável (fator de risco)	Valor de p
Idade	$p = 0.006$
Nº de gestações	$p = 0.48$
Dimensão do canil	$p = 1$
Estatuto vacinal	$p = 0.67$
Fase do ciclo éstrico	$p = 1$
Presença de TIC	$p = 0.34$
Existência de problemas reprodutivos	$p = 0.34$

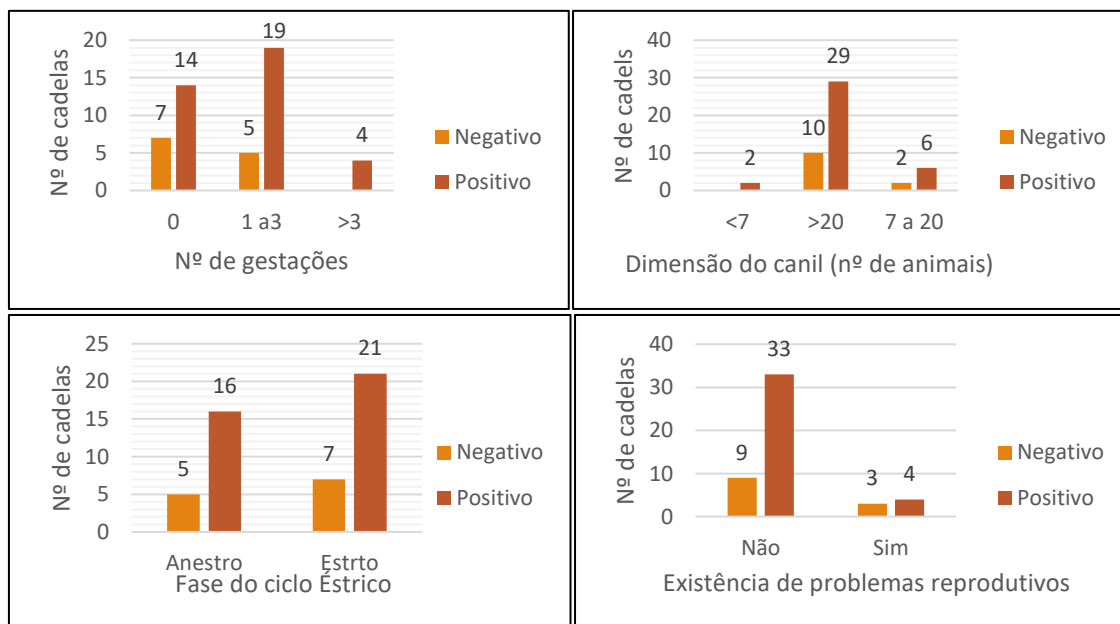
Foi encontrada uma associação significativa ($p = 0.006$) entre a infecção por CHV-1 e a idade dos animais. Com o aumento da idade existe uma maior probabilidade de encontrar animais infectados (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Distribuição dos animais positivos e negativos por classes de idade



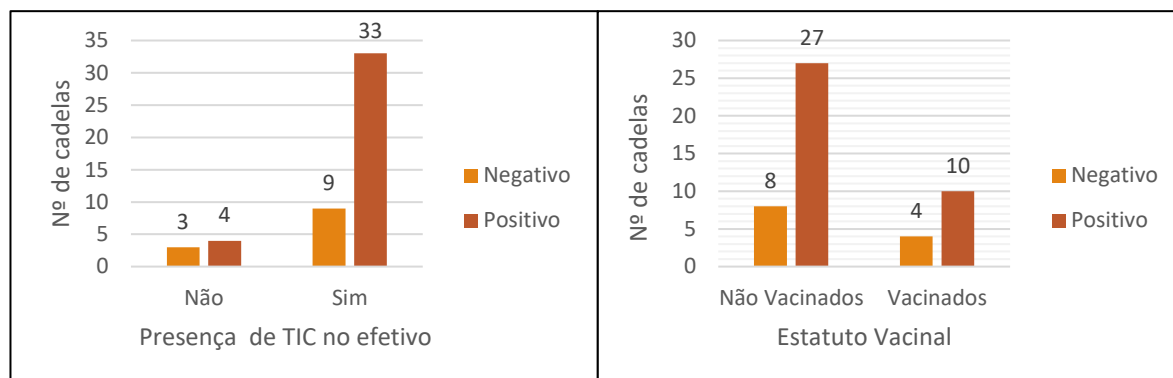
Não foi encontrada nenhuma associação significativa entre a infecção por CHV-1 e as variáveis: nº de gestações de cada cadela, dimensão do canil, fase do ciclo éstrico e existência de problemas reprodutivos (Tabela 6). Nos Gráficos 10, 11, 12, 13 podemos observar a distribuição dos animais positivos e negativos pelas variáveis anteriormente referidas.

Gráfico 10, 11, 12 e 13 – Distribuição de animais positivos e negativos pelas variáveis nº de gestações, dimensão do canil, fase do ciclo éstrico e existência de problemas reprodutivos



Não foi encontrada qualquer associação entre a infecção por CHV-1 e a presença de TIC no efetivo e também não foi encontrada uma associação entre o estatuto vacinal dos animais e a infecção por CHV-1 (Tabela 6). Os gráficos 14 e 15 representam a distribuição dos animais positivos e negativos pelas variáveis acima referidas.

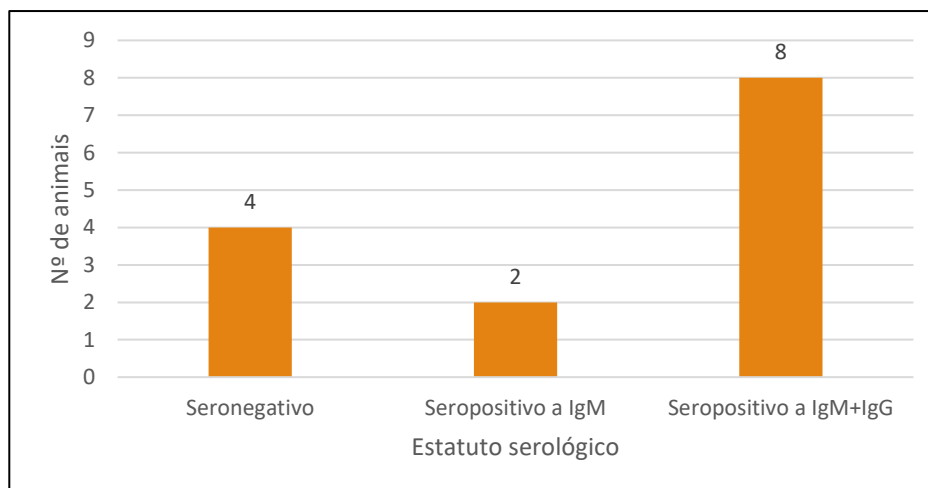
Gráfico 14 e 15 – Distribuição de animais positivos e negativos pelas variáveis estatuto vacinal e presença ou ausência de TIC no efetivo do canil a que pertencem



3.4 Resultados serológicos dos animais vacinados

A amostra deste estudo é composta por 14 animais vacinados. Destes animais, 4 apresentaram-se seronegativos. Dos 10 animais vacinados que se apresentaram seropositivos, 2 foram positivos a IgM e 8 foram positivos a IgG e IgM, simultaneamente (Gráfico 16).

Gráfico 16 – Estatuto serológico dos animais vacinados



4. Discussão

Com base na pesquisa bibliográfica efetuada, um único estudo realizado em Portugal, menciona uma frequência de 65% de seropositividade na população de cadelas analisada (Costa et al., 2014). Embora muitos criadores desconfiem da existência do vírus nos seus canis,

especialmente quando observam elevados níveis de mortalidade em ninhadas muito jovens, o diagnóstico etiológico é muitas vezes descartado e a presença, ou ausência, de CHV-1 fica por confirmar (Nauwynck, 2010). Os sinais subtis ou inexistentes em animais adultos, contribuem também para a desvalorização dos problemas causados pelo CHV-1, que é feita quer pelos tutores quer pelos clínicos.

Neste estudo um dos objetivos foi determinar a frequência do herpesvírus canino em canis de Lisboa e Coimbra e perceber se existe associação entre a infeção por CHV-1 e algumas variáveis que em alguns estudos anteriores foram identificadas como fatores de risco. Por último, visto que a nossa amostra foi composta por cadelas vacinadas e não vacinadas, tentou perceber-se quais as diferenças, no perfil serológico, que estes dois grupos apresentam entre si e que a que se podem dever essas diferenças.

As zaragatoas vaginais, nasais e oculares testadas por qPCR, foram todas negativas para a presença de CHV-1, algo que foi surpreendente uma vez que o CHV-1 é um vírus ubiquitário e todas as cadelas viviam em contacto com outros animais, quer nas suas rotinas diárias (passeios, presença de outros animais no canil) quer em eventos pontuais, como exposições. A inexistência de sinais clínicos ou lesões que indiquem uma possível infeção por CHV-1 torna, segundo Pratelli et al. (2014), mais difícil a deteção do vírus, o que pode ajudar a explicar estes resultados, uma vez que nenhuma das cadelas da amostra em estudo apresentava qualquer sinal clínico indicativo de infeção por CHV-1. A capacidade de latência do vírus é outra das explicações para a ausência de deteção do vírus, bem como o facto de aparentemente o período de excreção em cadelas com anticorpos contra os vírus ser muito curto e poder durar apenas alguns dias (Bottinelli et al., 2016; Ronsse et al., 2005). Em mulheres infetadas pelo herpesvírus simplex 2, o período de excreção vaginal do vírus é de facto menor nas que não apresentam sintomas da infeção (Wald, Zeh, Selke, Ashley, & Corey, 1995). O facto do teste molecular se apresentar negativo em cadelas que são simultaneamente seropositivas, demonstra que é necessária cautela quando da interpretação dos resultados do qPCR e que devem ser tidos em conta todos os fatores acima mencionados.

Na análise serológica 75,5% (n=37) das cadelas foram positivas para a presença de anticorpos anti-CHV-1, o que mostra uma elevada prevalência do vírus, tal como noutros países (Krogenæs et al., 2014; Ström Holst et al., 2012). É uma prevalência elevada, mas em comparação com outros estudos onde as amostras são cadelas de criação (embora neste estudo 3 cadelas não sejam provenientes de canis de criadores) é um valor esperado. Feyen et al. (2004), Krogenæs et al. (2014) e Ronsse et al. (2005) obtiveram valores de seropositividade de 62%, 85,5% e 100%, respetivamente. A comparação deste resultado com o resultado da

prevalência noutros países tem, no entanto, algumas condicionantes, uma vez que a amostra populacional e os métodos de diagnóstico de infeção são, muitas das vezes, bastante diferentes dos apresentados neste trabalho.

Os resultados apresentados permitiram, através da positividade a IgG e IgM, fazer uma avaliação da precocidade da infeção e da reativação do vírus. Dos animais seropositivos, 35,1% apresentavam seropositividade a IgM, 32,45% eram seropositivos a IgG e 32,45% eram positivos a ambas as imunoglobulinas. As IgM são, por norma, imunoglobulinas produzidas no primeiro contacto com os antígenos e têm um tempo de vida curto (Katz, Hilliard, Mirkovic, & Word, 1986), pelo que a infeção viral nos animais positivos a IgM seria mais recente do que nos animais positivos a IgG. As IgG são características de um estatuto imunológico mais consolidado, pelo que os animais positivos a IgG são animais que contactaram com o vírus há já algum tempo ou que estavam a sofrer uma reativação viral. Altos títulos de IgG (positividade a 1:100) são típicos de uma estimulação da imunidade de memória, que neste caso terá ocorrido através do contacto com o vírus selvagem, uma vez que nenhum dos animais foi vacinado recentemente, ou através da reativação do vírus latente. Os 32,45% que apresentaram seropositividade a ambas as imunoglobulinas encontravam-se, provavelmente, numa fase de transição entre uma primo-infeção e o estabelecimento de uma imunidade permanente. Embora não seja o cenário mais frequente, está também descrita a produção de IgM em reativações de herpesvírus latentes, pelo que a existência destas nem sempre é sinónimo de primo-infeção (Page et al., 2003).

Num estudo (Ronsse et al., 2005) em que foi feita a monitorização serológica de várias cadelas ao longo de um ciclo éstrico completo, todas as cadelas que inicialmente eram seronegativas, seroconverteram a determinada altura do ciclo éstrico, mostrando que a realização de colheitas seriadas em cada animal, ao invés de uma única colheita (como é o caso deste estudo) é provavelmente a melhor maneira de evitar falsos negativos, devido à capacidade de latência do vírus e à curta duração dos anticorpos anti-CHV-1 (Green, 2012).

Das variáveis analisadas neste trabalho, apenas foi possível encontrar uma associação entre a infeção por CHV-1 e a idade das cadelas ($p = 0.006$), mostrando que com o aumento da idade a probabilidade de encontrar cadelas seropositivas aumenta. Estes resultados podem ser explicados pelo facto de, com a idade, a possibilidade de contacto com animais infetados pelo vírus torna-se maior. Este resultado contrasta com o encontrado por outros estudos que não obtiveram qualquer associação entre a infeção por CHV-1 e a idade dos animais (Reading & Field, 1998; Ronsse et al., 2002). Outros, porém, corroboram este resultado (Nöthling et al., 2008; Ronsse et al., 2004; Van Gucht et al., 2001) e nos estudos de Ronsse et al. (2004) e

Krogenæs et al., (2012) os autores observaram um aumento no título de anticorpos a partir dos 6 meses e até aos 2 anos de idade, facto que os autores pensam que possa estar relacionado, não só com o aumento do contacto com outros animais nesse período de tempo, mas também com as alterações hormonais que ocorrem durante a puberdade e que podem facilitar a infeção por CHV-1 ou a sua reativação com consequente produção de anticorpos. No presente estudo o número de animais positivos aumenta consideravelmente a partir dos 2 anos de idade (Gráfico 11) tal como observado por Lacheretz & Cognard (1998). É também a partir dessa idade que muitos animais são cruzados o que pode indicar que para além da transmissão oronasal também a transmissão venérea pode ter um papel importante na transmissão da infeção, embora neste estudo algumas cadelas com 2 anos já terem realizado uma cobrição. Noutro estudo, os machos que já tinham realizado cobrições apresentaram maiores títulos de anticorpos do que aqueles que nunca tinham sido cruzados, o que reforça o papel da transmissão venérea (Ronsse et al., 2004)

Não foi encontrada qualquer associação entre o número de gestações e a seropositividade ($p=0,48$), embora o número de cadelas ($n=4$) que tiveram mais de 3 gestações seja muito baixo. Neste estudo também não foi possível estabelecer uma associação entre a existência de problemas reprodutivos e a infeção por CHV-1 ($p=0,34$). Nauwynck (2010) refere que muitas vezes os tutores atribuem ao CHV-1 um papel nos problemas reprodutivos das suas cadelas, sem, no entanto, realizarem o diagnóstico etiológico destes problemas, pelo que é possível que os problemas registados nada tenham a ver com o CHV-1. Tal resultado pode também ser explicado pelo pequeno número de cadelas que tinham no seu historial problemas reprodutivos ($n=7$) e pelo facto de não se ter feito qualquer distinção entre o período que passou desde a identificação dos problemas reprodutivos e as colheitas realizadas para este estudo. Desta forma é possível que animais com problemas causados pelo CHV-1 pudessem já não apresentar anticorpos detetáveis na altura das colheitas. Os problemas reprodutivos considerados neste estudo incluíram infertilidade, abortos, nados-mortos e cachorros mortos nas primeiras semanas de vida. Alguns estudos encontraram associação entre estes problemas e o CHV-1. Van Gucht et al., (2001) relatou que canis onde o vírus estava presente apresentavam maior frequência de cadelas com problemas de fertilidade e elevadas taxas de mortalidade neonatal. Poste e King (1971) referem a identificação de menores taxas de fertilidade relacionados com possíveis reabsorções embrionárias, o que foi demonstrado através de diagnóstico ecográfico por Ronsse et al., (2005). No entanto, a patofisiologia do herpesvírus canino, levanta ainda algumas questões. Ronsse et al. (2005) e Poulet et al., (2001) demonstraram que cadelas com baixo título de anticorpos durante o diestro ou durante o estro e a primeira metade do diestro,

respetivamente, têm menores índices de fertilidade, sugerindo que cadelas com altos títulos de anticorpos estarão mais protegidas contra a infecção *in utero*, ainda que, no mesmo estudo de 2005 existissem cadelas com títulos altos de anticorpos nestas fases do ciclo éstrico que apresentavam problemas reprodutivos, algo que os autores explicam sugerindo que nestes casos os problemas reprodutivos não se deveram à infecção por CHV-1 ou que a infecção *in utero* foi um fenómeno local, com a imunidade celular a desempenhar um papel importante no combate à infecção.

À semelhança de outros estudos (Nöthling et al., 2008) não foi encontrada qualquer associação entre a infecção por CHV-1 e a dimensão do canil, o que pode ser devido ao facto de, na nossa amostra, existir apenas um pequeno número de cadelas (n=2) que vivia num canil com menos de 7 animais. No entanto outros estudos sugerem que canis com maior densidade de animais têm mais animais seropositivos e com maior título de anticorpos, fazendo notar a importância da transmissão oronasal (Krogenæs et al., 2012; Ronsse et al., 2005; Ronsse et al., 2004)

Embora o herpesvírus canino faça parte dos agentes patogénicos encontrados na traqueobronquite infecciosa canina, neste trabalho não foi encontrada qualquer associação entre a presença desta nos canis e a infecção por CHV-1, o que pode ser devido ao facto de apenas 7 cadelas da amostra pertencerem a canis sem história de TIC no seu efetivo, uma vez que já foi referido noutros estudos que efetivos com historial de “tosse do canil” têm animais com maior título de anticorpos anti-CHV-1 e maior seroprevalência (Krogenæs et al., 2012; Ronsse et al., 2005; Ronsse et al., 2004). Segundo os mesmos autores a relação entre o número de animais num canil ou presença de traqueobronquite infecciosa canina e o aumento da seroprevalência de CHV-1 está intimamente ligado às condições de higiene num canil, algo que não foi avaliado neste estudo.

Outra variável que não apresentou qualquer associação com a infecção de herpesvírus canino foi a fase do ciclo éstrico em que cada cadela se encontrava quando das colheitas. Parte deste resultado pode ser devido ao facto de apenas 2 fases do ciclo terem sido avaliadas: estro e anestro, pelo que é impossível dizer se não existe uma associação durante outras fases do ciclo. Desde há muito tempo que se considera que o estro e o parto são alturas de risco para a reativação do CHV-1 (Anvik, 1991) e, noutras espécies, com outros herpesvírus, está descrita uma maior suscetibilidade das fêmeas nesta altura (Bujko, Sulović, Zivanović, Lako, & Dotlić, 1988; Thiry, Saliki, Schwes, & Pastoret, 1985), não só pelo stress que induzem como pelas alterações hormonais. No entanto, no caso do CHV-1, os estudos efetuados não encontram esta associação. No estudo de Ronsse et al., (2004) as cadelas em diestro possuíam títulos de anticorpos baixos ou inexistentes, embora apenas 4 cadelas tivessem sido analisadas nessa fase,

os autores sugeriram que esta pode ser uma fase suscetível para a infeção por CHV-1 ou que, simplesmente, as cadelas em questão nunca tinham contactado com o vírus. Dois estudos que monitorizaram sorologicamente as cadelas durante um ciclo éstrico completo, também não conseguiram detetar qualquer associação entre o título de anticorpos e as diferentes fases do ciclo éstrico: Ronsse et al., (2005) notou, porém uma tendência para o já referido decréscimo de anticorpos anti-CHV-1; Também Feyen et al., (2004) não encontrou qualquer associação, ainda que uma das cadelas em estudo tenha realizado seroconversão durante o estro. Ainda assim, mais estudos são necessários para compreender verdadeiramente a influência do ciclo éstrico na patofisiologia da infeção por CHV-1.

A amostra populacional deste estudo é composta por cadelas vacinadas e não vacinadas. Sabemos que todos os animais não vacinados que apresentaram anticorpos anti-CHV-1 (n=27) contactaram com o vírus de forma natural. Nos animais vacinados e seropositivos (n=10) não é possível avaliar se a seroconversão se deveu ao contacto com o antígeno vacinal ou com o vírus selvagem. Todos os animais vacinados foram vacinados, de acordo com o esquema recomendado, meses antes das colheitas efetuadas, pelo que era esperado que todos pudessem ser positivos a IgG; no entanto algumas destas cadelas (n=4) foram seronegativas o que vai ao encontro daquilo que é referido por Green (2012), sobre a curta duração dos anticorpos anti-CHV-1 (1 a 2 meses de altos títulos de anticorpos) e contra as observações de Ledbetter, Kim, Dubovi, Mohammed, & Felipe, (2016) que registaram anticorpos anti-CHV-1 vários meses após a vacinação. Outra explicação é que pode ter havido uma falha vacinal e as cadelas em questão não desenvolveram qualquer tipo de imunidade humoral. Os restantes animais vacinados apresentaram todos seropositividade a IgM, o que não era esperado, uma vez que estas são imunoglobulinas produzidas no primeiro contacto com o antígeno e estes animais já haviam contactado com o antígeno vacinal. Este fenómeno pode ter diferentes explicações: uma falha vacinal com os animais a não desenvolverem imunidade contra o CHV-1, tendo contactado com o vírus selvagem pouco tempo antes das colheitas. A deteção de IgM ocorre após o primeiro contacto com agentes infecciosos e, em humanos, no herpesvírus simplex, estas apresentam uma duração de 9-10 dias, após 1 ou 2 semanas do contacto com o vírus (Page et al., 2003) ; Os animais criaram imunidade, através da vacina, contra o CHV-1 que, entretanto, foi perdida e contactaram novamente com o vírus pouco tempo antes da colheita, montando novamente uma resposta imunitária de primeira linha; Houve uma reativação do vírus à qual os animais responderam com a produção de IgM, algo que está descrito em humanos infetados pelo vírus herpes simplex (Page et al., 2003) . A segunda hipótese reforça a necessidade de se realizar a vacinação em todas as gestações, segundo o protocolo recomendado pelo fabricante,

para que os cachorros fiquem devidamente protegidos após ingestão do colostro (Chabchoub et al., 2006; Pravieux, Poulet, Charreyre, & Juillard, 2007), uma vez que sugere que a resposta imunitária criada em vacinações anteriores não é suficiente para que haja títulos protetores de anticorpos nas subseqüentes gestações, no entanto são necessários mais estudos sobre a duração de anticorpos vacinais anti-CHV-1.

5. Conclusão

A necessidade de informações atualizadas sobre a frequência de herpesvírus em canis portugueses foi um dos motivos que impulsionou este trabalho.

Os resultados do PCR foram algo inesperados, tendo em conta a ubiquidade do vírus, o nº de animais testados e os resultados serológicos. No entanto, e não se tratando de caso único, são resultados que devem ser analisados tendo em conta a capacidade de latência do vírus, pelo que a inexistência de excreção viral não exclui a possibilidade de infeção.

A proporção de seropositivos encontrada (75,5%) confirma a ideia de muitos clínicos e tutores de que o CHV-1 é um vírus que está presente nos canis portugueses e que devido às oscilações serológicas que muitos animais apresentam noutros estudos, a melhor maneira de diminuir o número de falsos negativos será efetuar análises seriadas ao longo dos anos e em períodos críticos de stress como a introdução de novos animais, alterações de habitat, entre outros. São necessários mais estudos para compreender quais os fatores de risco que de facto promovem a infeção e a sua reativação e como é que estes influenciam a patofisiologia do vírus. Neste estudo foi encontrada uma associação entre o aumento da idade e o aumento do nº de seropositivos, algo que já havia sido observado e que confirma que é mais provável encontrar animais infetados em grupos etários mais velhos.

A discrepância observada entre os resultados do PCR e da Imunofluorescência Indireta, não foi inesperada, acentuando a ideia de que não existe um método de diagnóstico perfeito e que todos os resultados têm de ser criticamente analisados.

Ao longo deste trabalho foi possível perceber que os criadores estavam familiarizados com a existência do vírus em Portugal, embora a sua maioria nunca tivesse testado os seus animais nem vacinasse as suas cadelas. Alguns criadores, mesmo aqueles cujos animais não participaram no presente estudo, relataram dificuldades em encontrar a vacina no mercado português. No entanto, esta continua a ser a melhor forma de garantir a proteção de futuras ninhadas e o padrão serológico que os animais vacinados deste estudo apresentaram, sugere que a revacinação, em cada gestação, é fundamental para garantir que existem títulos altos de anticorpos protetores no colostro ingerido pelas ninhadas.

Capítulo III – Relatório de Estágio

Estágio Curricular

O estágio curricular, desenvolvido no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária teve lugar no Hospital Veterinário das Laranjeiras, durante um período de 6 meses, compreendido entre 1 de Setembro de 2016 e 20 de Fevereiro de 2017, sob a orientação do Dr. Francisco Silva e com a co-orientação da Professora Doutora Ana Duarte.

O Hospital Veterinário das Laranjeiras é uma unidade hospitalar localizada nas Laranjeiras, concelho e distrito de Lisboa, com a Direção Clínica do Dr. Luís Cruz e sob Administração e Gestão da Dr^a Ana Maldonado, com um corpo clínico composto por mais 7 médicos veterinários, 2 enfermeiras e 4 auxiliares de veterinária. São ainda realizadas consultas de referência na área de Comportamento Animal, Oftalmologia e Medicinas Complementares por médicos que não pertencem ao corpo clínico fixo do Hospital e o mesmo é válido para a execução de cirurgias ortopédicas. Integrado no Hospital Veterinário das Laranjeiras funciona também um hotel para gatos e uma petshop.

Os horários dos estagiários obedeciam a um plano de 40 horas semanais, num regime de rotação em função do número de estagiários, com turnos diários de 8h e noturnos de 12h, durante dias úteis e não úteis.

Durante o período de estágio foi possível observar e participar em diversas atividades das variadas áreas da Medicina Veterinária e nos vários serviços disponibilizados pelo Hospital, nomeadamente consultas, cirurgia ortopédica e de tecidos moles, exames complementares de diagnósticos e internamento.

Consultas

Durante o período de estágio foi possível acompanhar os médicos do Hospital na realização de várias consultas de diversas áreas. Foram realizadas consultas de medicina preventiva, de seguimento, de especialidade e de urgência. Nas consultas pude observar e executar a anamnese, exames físicos, colheita de amostras biológicas para posterior análise, administração de medicamentos e participar, com o médico responsável, na discussão e determinação de diagnósticos diferenciais e definitivos, bem como no plano de tratamento dos pacientes. Do total de animais apresentados à consulta, comigo presente, a maioria eram cães (Figura 1)



Cirurgia Ortopédica e de Tecidos Moles

Nas cirurgias tive a oportunidade de desempenhar funções de cirurgiã assistente, circulante e na maioria das vezes realização de monitorização anestésica e preparação pré-cirúrgica do animal (canulação de veias, administração de sedação, intubação, tricotomia, limpeza e antissépsia do campo cirúrgico).

Pude realizar, sob supervisão, destarizações em cães e gatos, orquiectomias em gatos, ovariectomias em gatas e pequenas suturas de aproximação.

As cirurgias mais frequentemente realizadas foram as ovariectomias eletivas em gatas e orquiectomias eletivas em gatos. Além destas, pude observar outras cirurgias referentes ao aparelho genito-urinário, como cistotomias, ovariectomias para resolução de piômetras e bypass uretral. Nas cirurgias da cavidade abdominal pude assistir a uma esplenectomia, uma tentativa de resolução de torção gástrica, várias enterotomias e uma hiorrafia umbilical.

Outras cirurgias consistiram na excisão de massas cutâneas, mastectomias, uma adrenalectomia e uma cirurgia de reconstrução. Pude também assistir a duas cirurgias ortopédicas de resolução de fraturas dos membros num gato e num cão.

Além de todas estas cirurgias, assisti, igualmente, à colocação de cateteres centrais para hemodiálise, colocação de tubo de esofagostomia e à realização de uma traqueostomia.

Exames Complementares e de Diagnóstico

Dos exames complementares e de diagnóstico realizados no Hospital Veterinário das Laranjeiras que pude efetuar destaco a realização de hemogramas, bioquímicas, testes rápidos de deteção de doenças infecciosas como a parvovirose ou leptospirose, citologias de conteúdo auricular e da pele, testes de coagulação, análises urinárias (sedimento e densidade) e eletrocardiograma.

Na vertente imagiológica, tive oportunidade de realizar e observar a realização de ecografias (abdominais e ecocardiografias), bem como procedimentos ecoguiados como pericardiocentese, abdominocentese, toracocentese e cistocentese. No raio-x digital a aluna procedeu tanto à sua realização, como ao posicionamento e contenção dos animais, bem como à sua interpretação com o auxílio dos médicos veterinários. Além destes exames eram regularmente efetuadas endoscopias que não só tinham uma vertente diagnóstica, mas também de tratamento nos casos de remoção de corpos estranhos gástricos. Foi possível visualizar e auxiliar na realização de rinoscopias, laringoscopias e gastroscopias.

Internamento

No internamento a principal função da aluna consistiu na monitorização dos animais internados através da medição de sinais vitais (batimentos cardíacos, movimentos respiratórios, pressões arteriais, pulso) e de outros parâmetros fisiológicos (glicémia, medição de ácido láctico, quantificação de urina produzida, medição da pressão ocular, tempo de repleção capilar). Além destas atividades, era função dos estagiários auxiliar nas alimentações, cuidados de enfermagem, no cálculo de dosagens e administração de medicações previstas e auxiliar na realização de fisioterapia.

Durante o internamento de alguns animais a aluna procedeu à cateterização, algaliação e colheita de sangue de alguns animais, bem como à monitorização de animais que realizavam transfusões.

Capítulo IV – Bibliografía

- Abhinay, G., Joseph, S., & Ambily, R. (2013). Seroprevalence of canine herpes virus in lithuanian dog population. *Veterinarija Ir Zootechnika*, 61(83), 72–73.
- Anvik, J. O. (1991). Clinical Considerations of Canine Herpesvirus Infection. *Veterinary Medicine*, 86(4), 394–403.
- Babaei, H., Akhtardanesh, B., Ghanbarpour, R., & Namjoo, A. (2010). Serological evidence of canine herpesvirus-1 in dogs of Kerman City, south-east of Iran. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57(5), 348–351.
- Bottinelli, M., Rampacci, E., Stefanetti, V., Marenzoni, M. L., Malmlov, A. M., Coletti, M., & Passamonti, F. (2016). Serological and biomolecular survey on canine herpesvirus-1 infection in a dog breeding kennel. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(5), 797–802.
- Brumitt, J. W., Cohn, L. A., & Essman, S. C. (2005). What Is Your Diagnosis ? History An 8-week-old sexually intact male Miniature Schnauzer was referred for dyspnea and abdominal distention of 1 day duration. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(1), 47–48.
- Bujko, M., Sulović, V., Zivanović, V., Lako, B., & Dotlić, R. (1988). Effect of progesterone and pregnancy on the replication of herpes simplex virus type 2 in vivo. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 15(1–2), 34–7.
- Burr, P. D., Campbell, M. E. M., Nicolson, L., & Onions, D. E. (1996). Detection of Canine Herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 53(3–4), 227–237.
- Carmichael, L. E. (2004). Recent Advances in Canine Infectious Diseases. In L. E. Carmichael (Ed.), *Neonatal Viral Infections of Pups: Canine Herpesvirus and Minute Virus of Canines (Canine Parvovirus-1)*. International Veterinary Information Service.
- Carmichael, L. E., Barnes, F. D., & Percy, D. H. (1969). Temperature as a factor in resistance of young puppies to canine herpesvirus. *The Journal of Infectious Diseases*, 120(6), 669–78.
- Carmichael, L. E., & Medic, B. L. S. (1978). Small-plaque variant of canine herpesvirus with reduced pathogenicity for newborn pups. *Infection and Immunity*, 20(1), 108–114.
- Carmichael, L. E., Squire, R. A., & Krook, L. (1965). Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. *American Journal of Veterinary Research*, 26(113), 803–14.
- Carmichael, L. E., Strandberg, J. D., & Barnes, F. D. (1965). Identification of a cytopathogenic agent infectious for puppies as a canine herpesvirus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 120(3), 644–50.
- Chabchoub, A., Kallel, F., Haddad, S., Landolsi, F., Rmili, M., & Van Gool, E. F. (2006). Evaluation de l'efficacité de la vaccination anti-herpes (vaccin inactivé) chez la chienne reproductrice selon deux protocoles différents : essai de terrain. *Revue Méd. Vét*, 157(12), 573–578.
- Costa, M., Mateus, L., Duarte, A., Tavares, L., & Fabrica, P. (2014). Estudo serológico de herpesvírus canino tipo 1 (CHV-1) em canis da região de Lisboa e Vale do Tejo. In *VI Congresso de Ciências Veterinárias* (p. 82). Oeiras: Sociedade Portuguesa de Ciências

Veterinárias.

- Dahlbom, M., Johnsson, M., Myllys, V., Taponen, J., & Andersson, M. (2009). Seroprevalence of canine herpesvirus-1 and *Brucella canis* in Finnish breeding kennels with and without reproductive problems. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(1), 128–131.
- Decaro, N., Amorisco, F., Desario, C., Lorusso, E., Camero, M., Bellacicco, A. L., & Buonavoglia, C. (2010). Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. *Journal of Virological Methods*, 169(1), 176–180.
- Decaro, N., Martella, V., & Buonavoglia, C. (2008). Canine Adenoviruses and Herpesvirus. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*.
- England, G. C. W., & Heimendahl, A. von. (2010). *Bsava Manual of Small Animal Reproduction & Neonatology*. (G. C. W. England & A. von Heimendahl, Eds.) (2nd ed.). Quedgeley: British Small Animal Veterinary Association.
- Erles, K., Dubovi, E. J., Brooks, H. W., & Brownlie, J. (2004). Longitudinal Study of Viruses Associated with Canine Infectious Respiratory Disease Longitudinal Study of Viruses Associated with Canine Infectious Respiratory Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4524–4529.
- Evermann, J. F., Ledbetter, E. C., & Maes, R. K. (2011). Canine Reproductive, Respiratory, and Ocular Diseases due to Canine Herpesvirus. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 41(6), 1097–1120.
- Evermann, J. F., McKeirnan, A. J., Ott, R. L., & Reed, L. A. (1982). Diarrheal condition in dogs associated with viruses antigenically related to feline herpesvirus. *The Cornell Veterinarian*, 72(3), 285–91.
- Feyen, B., Van Soom, A., Nauwynck, H., Devriese, L. A., Decostere, A., Catry, B., & De Kruif, A. (2004). The vaginal microflora and canine herpesvirus 1 antibody titers throughout the estrous cycle of breeding bitches. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 73(4), 260–268.
- Fontbonne, A. (2011). L'herpès-virose canine. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 164(4), 331–340.
- Gadsden, B. J., Maes, R. K., Wise, a. G., Kiupel, M., & Langohr, I. M. (2012). Fatal Canid herpesvirus 1 infection in an adult dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(3), 604–607.
- Gervais, K. J., Pirie, C. G., Ledbetter, E. C., & Pizzirani, S. (2012). Acute primary canine herpesvirus-1 dendritic ulcerative keratitis in an adult dog. *Veterinary Ophthalmology*, 15(2), 133–138.
- Góngora A., V., Sandoval Ch., N., & Manchego S., A. (2007). Evidencia serológica de la presencia del virus herpes canino tipo 1 en la provincia de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, (July), 154–157.
- Green, C. E. (2012). *Infectious Diseases of the Dog and Cat, Fourth Edition*. (Saunders, Ed.) (4th ed.). St. Louis: Elsevier Saunders.
- Hashimoto, A., Hirai, K., Fukushi, H., & Fujimoto, Y. (1983). The vaginal lesions of a bitch with a history of canine herpesvirus infection. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 45(1), 123–126.

- Hashimoto, A., Hirai, K., Okada, K., & Fujimoto, Y. (1979). Pathology of the placenta and newborn pups with suspected intrauterine infection of canine herpesvirus. *American Journal of Veterinary Research*, 40(9), 1236–40.
- Hashimoto, A., Hirai, K., Yamaguchi, T., & Fujimoto, Y. (1982). Experimental transplacental infection of pregnant dogs with canine herpesvirus. *American Journal of Veterinary Research*, 43(5), 844–50.
- Hill, H., & Maré, C. J. (1974). Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. *American Journal of Veterinary Research*, 35(5), 669–72.
- Kapil, S. (2015). Canid herpesvirus 1 (CHV-1)-related disease in older puppies and CHV-1 shedding in the vagina of adult pregnant dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(6), 758–761.
- Kapil, S. (2016). US20160051663 A1. United States of America. Disponível em <https://www.google.com/patents/US20160051663>
- Karpas, A., King, N. W., Garcia, F. G., Calvo, F., & Cross, R. E. (1968). Canine Tracheobronchitis: Isolation and Characterization of the Agent with Experimental Reproduction of the Disease. *Experimental Biology and Medicine*, 127(1), 45–52.
- Katz, D., Hilliard, J. K., Mirkovic, R. R., & Word, R. A. (1986). ELISA for detection of IgG and IgM antibodies to HSV-1 and HSV-2 in human sera. *Journal of Virological Methods*, 14(1), 43–55.
- Kawakami, K., Ogawa, H., Maeda, K., Imai, A., Ohashi, E., Matsunaga, S., ... Mochizuki, M. (2010). Nosocomial outbreak of serious canine infectious tracheobronchitis (kennel cough) caused by canine herpesvirus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1176–1181.
- Kramer, J. W., Evermann, J. F., Leathers, C. W., McKeirnan, a. J., & Rashti, L. (1991). Experimental Infection of Two Dogs with a Canine Isolate of Feline Herpesvirus Type 1. *Veterinary Pathology*, 28(4), 338–340.
- Krogenæs, A., Rootwelt, V., Larsen, S., Renström, L., Farstad, W., & Lund, A. (2014). A serological study of canine herpesvirus-1 infection in a population of breeding bitches in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), 19.
- Krogenæs, A., Rootwelt, V., Larsen, S., Sjøberg, E. K., Akselsen, B., Skår, T. M., & Lund, A. (2012). A serologic study of canine herpes virus-1 infection in the Norwegian adult dog population. *Theriogenology*, 78(1), 153–158.
- Kumar, S., Driskell, E. A., Cooley, A. J., Jia, K., Blackmon, S., Wan, X.-F., ... Hogan, R. J. (2014). Fatal Canid Herpesvirus 1 Respiratory Infections in 4 Clinically Healthy Adult Dogs. *Veterinary Pathology*, 52(4), 681–687.
- Lacheretz, A., & Cognard, S. (1998). Epidémiologie et diagnostic sérologique de l'herpès-virose canine. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 8–9(149), 853–6.
- Lara, E. G. V., Solis, J. I. Á., Verde, C. C., Crespo, J. A. M., Marín, L. C., García, J. C. D. R., & Anda, G. V. (2016). Canine Herpesvirus Seroprevalence and Associated Factors in Dogs of Mexico. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 6(10), 149–162.
- Larsen, R. W., Kiupel, M., Balzer, H.-J., & Agerholm, J. S. (2015). Prevalence of canid herpesvirus-1 infection in stillborn and dead neonatal puppies in Denmark. *Acta*

- Ledbetter, E. C. (2013). Canine herpesvirus-1 ocular diseases of mature dogs. *New Zealand Veterinary Journal*, 61(4), 193–201.
- Ledbetter, E. C., da Silva, E. C., Kim, S. G., Dubovi, E. J., & Schwark, W. S. (2012). Frequency of spontaneous canine herpesvirus-1 reactivation and ocular viral shedding in latently infected dogs and canine herpesvirus-1 reactivation and ocular viral shedding induced by topical administration of cyclosporine and systemic administration of. *American Journal of Veterinary Research*, 73(7), 1079–1084.
- Ledbetter, E. C., Dubovi, E. J., Kim, S. G., Maggs, D. J., & Bicalho, R. C. (2009). Experimental primary ocular canine herpesvirus-1 infection in adult dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 70(4), 513–521.
- Ledbetter, E. C., Hornbuckle, W. E., & Dubovi, E. J. (2009). Virologic survey of dogs with naturally acquired idiopathic conjunctivitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(8), 954–959.
- Ledbetter, E. C., Kice, N. C., Matusow, R. B., Dubovi, E. J., & Kim, S. G. (2010). The effect of topical ocular corticosteroid administration in dogs with experimentally induced latent canine herpesvirus-1 infection. *Experimental Eye Research*, 90(6), 711–717.
- Ledbetter, E. C., Kim, K., Dubovi, E. J., Mohammed, H. O., & Felipe, M. J. B. (2016). Clinical and immunological assessment of therapeutic immunization with a subunit vaccine for recurrent ocular canine herpesvirus-1 infection in dogs. *Veterinary Microbiology*, 197, 102–110.
- Ledbetter, E. C., Kim, S. G., & Dubovi, E. J. (2009). Outbreak of ocular disease associated with naturally-acquired canine herpesvirus-1 infection in a closed domestic dog colony. *Veterinary Ophthalmology*, 12(4), 242–247.
- Ledbetter, E. C., Kim, S. G., Dubovi, E. J., & Bicalho, R. C. (2009). Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Veterinary Microbiology*, 138(1–2), 98–105.
- Ledbetter, E. C., Riis, R. C., Kern, T. J., Haley, N. J., & Schatzberg, S. J. (2006). Corneal ulceration associated with naturally occurring canine herpesvirus-1 infection in two adult dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(3), 376–84.
- Lee, H., Hong, S., Lee, Y., Kim, D., Kwon, H., Lee, C., & Kim, O. (2014). Effects of cold stress as a pathogenic factor on fatal disease progression of canine herpesvirus, 15(3), 100–106.
- Lust, G., & Carmichael, L. E. (1971). Suppressed synthesis of viral dna, protein, and mature virions during replication of canine herpesvirus at elevated temperature. *Journal of Infectious Diseases*, 124(6), 572–580.
- Maeda, K., Ono, M., Kawaguchi, Y., Niikura, M., Okazaki, K., Yokoyama, N., & Mikami, T. (1996). Expression and properties of feline herpesvirus type 1 gD (hemagglutinin) by a recombinant baculovirus. *Virus Research*, 46(1–2), 75–80.
- Maeda, K., Xuan, X., Kawaguchi, Y., Ono, M., Yokoyama, N., Fujita, K., & Mikami, T. (1997). Characterization of canine herpesvirus glycoprotein D (hemagglutinin). *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 59(11), 1003–9.

- Malone, E. K., Ledbetter, E. C., Rassnick, K. M., Kim, S. G., & Russell, D. (2010). Disseminated canine herpesvirus-1 infection in an immunocompromised adult dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(4), 965–968.
- Martina, B. E. E., Harder, T. C., & Osterhaus, A. D. M. E. (2003). Genetic characterization of the unique short segment of Phocid herpesvirus type 1 reveals close relationships among alphaherpesviruses of hosts of the order Carnivora. *Journal of General Virology*, 84(6), 1427–1430.
- Miyoshi, M., Ishii, Y., Takiguchi, M., Takada, A., Yasuda, J., Hashimoto, A., & Kida, H. (1999). Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 61(4), 375–379.
- Nakamichi, K., Ohara, K., Matsumoto, Y., & Otsuka, H. (2000). Attachment and penetration of canine herpesvirus 1 in non-permissive cells. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11039592>
- Nauwynck, H. (2010). Canine herpes virus 1 - infection in dogs: Truth and lies. In *7th EVSSAR Congress , Louvain-La-Neuve, Belgium* (pp. 47–49). European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR).
- Nemoto, K., Horimoto, T., Xuan, X. N., Kusanagi, K., Takumi, A., Tohya, Y., & Mikami, T. (1990). Demonstration of canine herpesvirus-specific hemagglutination. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 52(2), 395–8. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2161479>
- Nicklin, A. M., McEntee, M. C., & Ledbetter, E. C. (2014). Effects of ocular surface strontium-90 beta radiotherapy in dogs latently infected with canine herpesvirus-1. *Veterinary Microbiology*, 174(3–4), 433–437.
- Nishikawa, Y., Ikeda, H., Fukumoto, S., Xuan, X., Nagasawa, H., Otsuka, H., & Mikami, T. (2000). Immunisation of dogs with a canine herpesvirus vector expressing Neospora caninum surface protein, NcSRS2. *International Journal for Parasitology*, 30(11), 1167–1171.
- Nishikawa, Y., Xuan, X., Kimura, M., & Otsuka, H. (1999). Characterization of pseudorabies virus glycoprotein B expressed by canine herpesvirus. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 61(10), 1113–7.
- Nishikawa, Y., Xuan, X., & Otsuka, H. (1998). Identification and characterization of the glycoprotein E and I genes of canine herpesvirus. *Virus Research*, 56(1), 77–92.
- Nöthling, J. O., Hüßy, D., Steckler, D., & Ackermann, M. (2008). Seroprevalence of canine herpesvirus in breeding kennels in the Gauteng Province of South Africa. *Theriogenology*, 69(3), 276–282.
- Okuda, Y., Hashimoto, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Mori, S., Tani, M., ... Carmichael, L. (1993). Repeated canine herpesvirus (CHV) reactivation in dogs by an immunosuppressive drug. *The Cornell Veterinarian*, 83(4), 291–302. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8306652>
- Page, J., Taylor, J., Tideman, R. L., Seifert, C., Marks, C., Cunningham, A., & Mindel, A. (2003). Is HSV serology useful for the management of first episode genital herpes? *Sexually Transmitted Infections*, 79(4), 276–279.

- Papageorgiou, K. V., Suarez, N. M., Wilkie, G. S., McDonald, M., Graham, E. M., & Davison, A. J. (2016). Genome sequence of canine herpesvirus. *PLoS ONE*, 11(5), 1–11.
- Parzefall, B., Fischer, A., Blutke, A., Schmahl, W., & Matiassek, K. (2011). Naturally-occurring canine herpesvirus-1 infection of the vestibular labyrinth and ganglion of dogs. *Veterinary Journal*, 189(1), 100–102.
- Percy, D. H., Carmichael, L. E., Albert, D. M., King, J. M., & Jonas, A. M. (1971). Lesions in Puppies Surviving Infection with Canine Herpesvirus. *Veterinary Pathology Online*, 8(1), 37–53.
- Piewbang, C., Rungsipipat, A., Poovorawan, Y., & Techangamsuwan, S. (2016). Development and application of multiplex PCR assays for detection of virus-induced respiratory disease complex in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(12), 1847–1854.
- Piewbang, C., Rungsipipat, A., Poovorawan, Y., & Techangamsuwan, S. (2017). Viral molecular and pathological investigations of Canid herpesvirus 1 infection associated respiratory disease and acute death in dogs. *Acta Veterinaria*, 67(1), 11–24.
- Poste, G. (1972). Characterization of a new canine herpes virus. *Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung*, 36(1), 147–57.
- Poste, G., & King, N. (1971). Isolation of a herpesvirus from the canine genital tract: association with infertility, abortion and stillbirths. *The Veterinary Record*, 88(9), 229–33. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4323253>
- Poulet, H. (2005). Actualités et questions sur l'herpèsvirose canine. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 158(4), 353–361.
- Poulet, H., Guigal, P. M., Soulier, M., Leroy, V., Fayet, G., Minke, J., & Chappuis Merial, G. (2001). Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams. *The Veterinary Record*, 148(22), 691–695.
- Pratelli, A., Colao, V., & Losurdo, M. (2014). Serological and virological detection of canine herpesvirus-1 in adult dogs with and without reproductive disorders. *Veterinary Journal*, 200(2), 257–260.
- Pravieux, J. J., Poulet, H., Charreyre, C., & Juillard, V. (2007). Protection of Newborn Animals through Maternal Immunization. *Journal of Comparative Pathology*, 137(1), S32-4.
- Reading, M. J., & Field, H. J. (1998). A serological study of canine herpes virus-1 infection in the English dog population. *Archives of Virology*, 143(8), 1477–1488.
- Reubel, G. H., Pekin, J., Venables, D., Wright, J., Zabar, S., Leslie, K., ... Braid, A. (2001). Experimental infection of European red foxes (*Vulpes vulpes*) with canine herpesvirus. *Veterinary Microbiology*, 83(3), 217–233.
- Reubel, G. H., Wright, J., Pekin, J., French, N., & Strive, T. (2006). Suitability of canine herpesvirus as a vector for oral bait vaccination of foxes. *Veterinary Microbiology*, 114(3–4), 225–39.
- Rijsewijk, F. A. M., Luiten, E. J., J. Daus, F., Van Der Heijden, R. W., & Van Oirschot, J. T. (1999). Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997-1998. *Veterinary Microbiology*, 65(1), 1–7.
- Ronsse, V., Verstegen, J., Onclin, K., Farnir, F., & Poulet, H. (2004). Risk factors and

reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology*, 61(4), 619–636.

Ronsse, V., Verstegen, J., Onclin, K., Guiot, A. L., Aeberlé, C., Nauwynck, H. J., & Poulet, H. (2002). Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 2000. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(5), 299–304.

Ronsse, V., Verstegen, J., Thiry, E., Onclin, K., Aeberl, C., Brunet, S., & Poulet, H. (2005). Canine herpesvirus-1 (CHV-1): Clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology*, 64(1), 61–74.

Schulze, C., & Baumgärtner, W. (1998). Nested Polymerase Chain Reaction and In Situ Hybridization for Diagnosis of Canine Herpesvirus Infection in Puppies. *Veterinary Pathology*, 35(3), 209–217.

Smith, K. C. (1997). Herpesviral abortion in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 153(3), 253–268.

Sonne, L. (2009). Clinic and pathological findings in dogs naturally infected with canine herpesvirus, (August).

Spertus, C. B., Mohammed, H. O., & Ledbetter, E. C. (2016). Effects of topical ocular application of 1% trifluridine ophthalmic solution in dogs with experimentally induced recurrent ocular canine herpesvirus-1 infection. *American Journal of Veterinary Research*, 77(10), 1140–7.

Spertzel, R. O., Huxsoll, D. L., McConnell, S. J., Binn, L. N., & Yager, R. H. (1965). Recovery and Characterization of a Herpes-like Virus from Dog Kidney Cell Cultures. *Experimental Biology and Medicine*, 120(3), 651–655.

Springer, S. L., Vite, C. H., Polesky, A. C., Kesari, S., Fraser, N. W., & Wolfe, J. H. (2001). Infection and establishment of latency in the dog brain after direct inoculation of a nonpathogenic strain of herpes simplex virus-1. *J Neurovirol*, 7(2), 149–154.

Stewart, S. E., David-Ferreira, J., Lovelace, E., Landon, J., & Stock, N. (1965). Herpes-like virus isolated from neonatal and fetal dogs. *Science (New York, N.Y.)*, 148(3675), 1341–3.

Strive, T., Hardy, C. M., Wright, J., & Reubel, G. H. (2007). A virus vector based on Canine Herpesvirus for vaccine applications in canids. *Veterinary Microbiology*, 119(2–4), 173–83.

Ström Holst, B., Hagberg Gustavsson, M., Grapperon-Mathis, M., Lilliehöök, I., Johannisson, A., Isaksson, M., ... Axné, E. (2012). Canine Herpesvirus During Pregnancy and Non-Pregnant Luteal Phase. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(6), 362–365.

Swiss Institute of Bioinformatics (2010). *Virion organization of Herpesvirus*. Acedido em Nov. 8, 2017, Disponível em <https://viralzone.expasy.org/5796>.

Takumi, A., Kusanagi, K., Tuchiya, K., Xuan, X., Azetaka, M., & Takahashi, E. (1990). Serodiagnosis of canine herpesvirus infection - Development of an enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with two improved methods of serum neutralization test. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 52(2), 241–250.

Tanaka, T., Nakatani, S., Xuan, X., Kumura, H., Igarashi, I., & Shimazaki, K. I. (2003). Antiviral activity of lactoferrin against canine herpesvirus. *Antiviral Research*, 60(3), 193–199.

- Thiry, E., Saliki, J., Schwers, A., & Pastoret, P. P. (1985). Parturition as a stimulus of IBR virus reactivation. *The Veterinary Record*, 116(22), 599–600.
- Van Gucht, S., Nauwynck, H., & Pensaert, M. (2001). Prevalence of canine herpesvirus in kennels and the possible association with fertility problems and neonatal death. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 70(3), 204–211.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*.
- Wald, A., Zeh, J., Selke, S., Ashley, R. L., & Corey, L. (1995). Virologic characteristics of subclinical and symptomatic genital herpes infections. *The New England Journal of Medicine*, 333(12), 770–5.
- Wright, N. G., & Cornwell, H. J. C. (1969). The Susceptibility of Six-Week old Puppies to Canine Herpes Virus. *Journal of Small Animal Practice*, 10(11), 669–674.
- Xuan, X., Horimoto, T., Limcumpao, J. A., Tohya, Y., Takahashi, E., & Mikami, T. (1992). Glycoprotein-specific immune response in canine herpesvirus infection. *Archives of Virology*, 122(3–4), 359–65.
- Xuan, X., Kojima, A., Murata, T., Mikami, T., & Otsuka, H. (1997). Analysis of canine herpesvirus gB, gC and gD expressed by a recombinant vaccinia virus. *Archives of Virology*, 142(5), 1003–10.
- Xuan, X., Tuchiya, K., Sato, I., Nishikawa, Y., Onoderaz, Y., Takashima, Y. & Otsuka, H. (1998). Biological and immunogenic properties of rabies virus glycoprotein expressed by canine herpesvirus vector. *Vaccine*, 16(9–10), 969–76.
- Yamamura, T., Minato, Y., Kojima, A., & Okaniwa, A. (1992). Electron microscopy of renal arterial lesion in a pup infected with canine herpes virus. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 54(4), 779–80.
- Yanagisawa, T., Azetaka, M., Midoro, K., Takahashi, R., Fujiwara, K., & Sawa, K. (1987). Fatal herpesvirus infection in a litter of puppies. *Nihon Juigaku Zasshi. The Japanese Journal of Veterinary Science*, 49(3), 519–22.
- Yanai, T., Fujishima, N., Fukushi, H., Hirata, A., Sakai, H., & Masegi, T. (2003). Experimental infection of equine herpesvirus 9 in dogs. *Veterinary Pathology*, 40(3), 263–7.
- Yeşilbağ, K., Yalçın, E., Tuncer, P., & Yilmaz, Z. (2012). Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in Turkish dog population. *Research in Veterinary Science*, 92(1), 36–39.

Capítulo V – Anexos

Anexo I – Inquérito efetuado aos tutores para identificação e caracterização da amostra em estudo

Ficha de Identificação

Nome do Proprietário: _____

Nome do Canil: _____

Morada: _____

Código Postal: ____ - ____ Localidade: _____

Contacto: _____ Nº de Cães no Canil: _____

E-mail: _____

Já ouviu falar do Herpesvírus Canino?

☐ Sim

☐ Não

Alguma vez testou algum dos seus cães para Herpesvírus Canino?

☐ Sim

☐ Não

Se “Sim”, resultado?

☐ Positivo

☐ Negativo

Alguma vez teve, no seu canil, problemas reprodutivos?

☐ Sim

☐ Não

Costuma fazer o doseamento da Progesterona e/ou citologia vaginal nas suas cadelas antes do cruzamento?

☐ Sim

☐ Não

Conhece a vacina contra o Herpesvírus Canino (“*Eurican® Herpes 205*”)?

☐ Sim

☐ Não

Alguma vez vacinou alguma das suas cadelas contra o herpesvírus canino?

☐ Sim

☐ Não

Já teve “Tosse do Canil”?

☐ Sim

☐ Não

Ficha do Animal (agregar à ficha de identificação do proprietário)

Cadelas Reprodutoras

Nome _____ do

Animal: _____

Raça: _____

Idade: _____

Anamnese:

Costuma vacinar a cadela contra o Herpesvírus Canino ("Eurican® Herpes 205")?

☐

Sim

☐

Não

Alguma vez testou a cadela para herpesvírus?

☐

Sim

☐

Não

Se "Sim", qual o resultado?

☐

Positivo

☐

Negativo

Há quanto tempo foi último Cio? _____(meses)

Costuma ter cios regulares?

☐

Sim

☐

Não

Alguma vez cruzou a cadela?

☐

Sim

☐

Não

Alguma vez cruzou com um macho proveniente de outro canil?

☐

Sim

☐

Não

Que tipo de cruzamentos já fez?

☐

Inseminação Artificial

☐

Monta Natural

Se já fez inseminação artificial, indique os tipos de sémen já utilizados:

☐

Fresco

☐

Refrigerado

☐

Congelado

Tem historial de infertilidade (cruzamento sem obter ninhada) por motivo desconhecido?

☐

Sim

☐

Não

Se seleccionou "Sim", fez doseamento da progesterona/citologia vaginal antes do cruzamento?

☐

Sim

☐

Não

Já ficou alguma vez gestante?

☐ Sim

☐ Não

Se “Sim”, continue o questionário.

Dos problemas seguintes, indique qual/quais já estiveram presentes, por razões desconhecidas, em gestações anteriores:

☐ Aborto

☐ Cachorros mortos à nascença

☐ Cachorros que morreram na 1ª semana de Vida

☐ Cachorros que morreram entre a 1ª semana e até às 8 semanas de idade

Quantas ninhadas já teve? _____

Quantos cachorros (média), por ninhada? _____

Há quanto tempo teve a última ninhada? _____

Amostras:

☐ Zaragatoa Vaginal (Nº _____)

☐ Zaragatoa Oronasal (Nº _____)

☐ Zaragatoa Conjuntival (Nº _____)

☐ Colheita de Sangue (Nº _____)

☐ Lâmina para Citologia (Nº _____)

☐ Placenta (Nº _____)

Notas:

Data

Anexo II – Resultados da imunofluorescência indireta e dos inquéritos efetuados

Nome	Idade	Gestação	Tamanho do Canil	IgM 1/20	IgM 1/100	IgG 1/20	IgG 1/100	Combinação	Estatuto Vacinal	Ciclo Éstrico	Canil com tosse do canil	Cadelas com Problemas reproductivos
Nº1	2 1a3	<7		N	N	P	P	NNPP	NV	E	N	S
Nº2	7	0 7 a 20		P	N	P	N	PNNP	NV	E	N	N
Nº3	3 1a3	>20		N	N	N	N	NNNN	V	E	N	S
Nº4	5 1a3	7 a 20		P	N	P	N	PNNP	V	E	N	N
Nº5	3	0 7 a 20		P	P	P	N	PPPN	NV	E	S	N
Nº6	4	0 7 a 20		P	N	P	N	PNNP	V	E	S	S
Nº7	5 1a3	>20		N	N	N	N	NNNN	V	E	S	S
Nº8	3 1a3	>20		N	N	N	N	NNNN	V	E	N	S
Nº9	4 1a3	>20		N	N	N	N	NNNN	V	E	N	N
Nº10	9 1a3	7 a 20		N	N	N	N	NNNN	NV	E	S	N
Nº11	1	0 7 a 20		P	P	N	N	PPNN	NV	E	N	N
Nº12	4	0 <7		P	N	N	N	PNNN	NV	E	S	S
Nº13	4 1a3	7 a 20		P	N	P	N	PNNP	V	E	S	S
Nº14	4 1a3	>20		P	N	P	N	PNNP	V	E	S	N
Nº15	4 1a3	>20		P	N	P	N	PNNP	V	E	S	N
Nº16	2 1a3	>20		P	N	N	N	PNNN	V	E	S	N
Nº17	2	0 >20		P	N	N	N	PNNN	V	E	S	N
Nº18	3 1a3	>20		P	N	P	N	PNNP	V	E	S	N
Nº19	2	0 >20		P	N	P	N	PNNP	V	E	S	N
Nº20	4	0 >20		P	N	P	N	PNNP	V	E	S	N
Nº21	2	0 7 a 20		N	N	N	N	NNNN	NV	E	S	N
Nº22	3	0 >20		P	N	N	N	PNNN	NV	E	S	N
Nº23	5 1a3	>20		N	N	P	P	NNPP	NV	A	S	N
Nº24	2 1a3	>20		P	N	N	N	PNNN	NV	A	S	N
Nº25	6 >3	>20		P	P	P	N	PPPN	NV	A	S	N
Nº26	8 >3	>20		P	P	N	N	PPNN	NV	A	S	N
Nº27	0,75	0 >20		N	N	N	N	NNNN	NV	A	S	N
Nº28	2 1a3	>20		P	N	N	N	PNNN	NV	A	S	N
Nº29	7 >3	>20		N	N	P	N	NNPN	NV	E	S	N
Nº30	8 >3	>20		N	N	P	N	NNPN	NV	E	S	N
Nº31	5 1a3	>20		P	N	P	P	PNPP	NV	A	S	N
Nº32	3 1a3	>20		N	N	P	N	NNPN	NV	A	S	N
Nº33	3 1a3	>20		N	N	P	N	NNPN	NV	A	S	N
Nº34	3 1a3	>20		N	N	P	P	NNPP	NV	A	S	N
Nº35	5 1a3	>20		N	N	P	N	NNPN	NV	A	S	N
Nº36	6 1a3	>20		N	N	P	N	NNPN	NV	A	S	N
Nº37	3 1a3	>20		N	N	P	P	NNPN	NV	A	S	N
Nº38	5 1a3	>20		N	N	P	N	NNPN	NV	A	S	N
Nº39	3 1a3	>20		N	N	P	N	NNPN	NV	E	S	N
Nº40	0,67	0 >20		N	N	N	N	NNNN	NV	A	S	N
Nº41	0,75	0 >20		N	N	N	N	NNNN	NV	A	S	N
Nº42	0,58	0 >20		N	N	N	N	NNNN	NV	A	S	N
Nº43	0,75	0 >20		P	N	N	N	PNNN	NV	A	S	N
Nº44	1	0 >20		N	N	N	N	NNNN	NV	A	S	N
Nº45	1	0 >20		P	N	N	N	PNNN	NV	A	S	N
Nº46	1	0 >20		P	N	N	N	PNNN	NV	A	S	N
Nº47	0,92	0 >20		N	N	N	N	NNNN	NV	E	S	N
Nº48	2	0 >20		P	N	N	N	PNNN	NV	E	S	N
Nº49	4	0 >20		P	P	N	N	PPNN	NV	E	S	N

Anexo III – Resultados da quantificação do ADN espectrofotómetro *Nanodrop 2000c Spectrophotometer*

Identificação da amostra	Amostras (ng/μl)	Rácio 260/280
Nº1 vaginal	0,5	-10,1
Nº1 nasal	3,6	1,82
Nº1 ocular	8,2	1,86
Nº2 vaginal	0,6	-3,65
Nº2 nasal	15,3	1,9
Nº2 ocular	4,4	1,75
Nº3 vaginal	4,1	2,18
Nº3 nasal	2,2	2,5
Nº3 ocular	7,2	1,82
Nº4 vaginal	20,1	1,91
Nº4 nasal	14,9	1,95
Nº4 ocular	12,1	1,78
Nº5 vaginal	17,2	1,88
Nº5 nasal	16,5	1,82
Nº5 ocular	5,7	1,63
Nº6 vaginal	2,7	1,92
Nº6 nasal	5,6	1,72
Nº6 ocular	8	1,7
Nº7 vaginal	2,8	2,05
Nº7 nasal	1,5	1,62
Nº7 ocular	12	1,9
Nº8 vaginal	3	2,2
Nº8 nasal	2,3	1,85
Nº8 ocular	7,2	1,87
Nº9 vaginal	7,7	1,49
Nº9 nasal	5,8	1,45
Nº9 ocular	13,1	1,67
Nº10 vaginal	0,3	-1,53
Nº10 nasal	1,8	1,65
Nº10 ocular	10,3	1,83
Nº11 vaginal	15,1	1,83
Nº11 nasal	8,4	1,69
Nº11 ocular	7,6	1,79
Nº12 vaginal	22,3	1,74
Nº12 nasal	6,7	1,73
Nº12 ocular	9,7	1,86
Nº13 vaginal	7,2	2,05
Nº13 nasal	4,7	1,48
Nº13 ocular	1,4	2,57
Nº14 vaginal	7,1	1,57
Nº14 nasal	3,8	1,39
Nº14 ocular	3,2	1,37
Nº15 vaginal	6,5	1,7
Nº15 nasal	3,8	1,28
Nº15 ocular	2,8	1,16
Nº16 vaginal	5,2	1,82

Nº16 nasal	5,7	1,73
Nº16 ocular	4,1	1,9
Nº17 vaginal	4,6	1,46
Nº17 nasal	2,6	1,17
Nº17 ocular	2,7	1,47
Nº18 vaginal	3,7	1,14
Nº18 nasal	6,5	1,49
Nº18 ocular	4,6	0,95
Nº19 vaginal	10,7	1,97
Nº19 nasal	2,3	1,91
Nº19 ocular	4,6	1,58
Nº20 vaginal	7,1	2,07
Nº20 nasal	4,2	2,92
Nº20 ocular	6,3	1,94
Nº21 vaginal	4,6	1,72
Nº21 nasal	14,9	1,52
Nº21 ocular	14,5	1,53
Nº22 vaginal	5,5	1,66
Nº22 nasal	7	1,3
Nº22 ocular	6,5	1,52
Nº23 vaginal	5,3	1,54
Nº23 nasal	1,7	1,62
Nº23 ocular	7,7	1,85
Nº24 vaginal	66,3	1,93
Nº24 nasal	1,3	1,25
Nº24 ocular	50,7	1,97
Nº25 vaginal	9	1,76
Nº25 nasal	2,6	1,48
Nº25 ocular	14,9	1,88
Nº26 vaginal	23,9	1,92
Nº26 nasal	10	1,85
Nº26 ocular	44,8	1,9
Nº27 vaginal	4,1	1,86
Nº27 nasal	7,3	1,91
Nº27 ocular	18,5	1,85
Nº28 vaginal	4,7	2,21
Nº28 nasal	3,5	1,62
Nº28 ocular	44,8	1,84
Nº29 vaginal	1,8	3,58
Nº29 nasal	4	2,32
Nº29 ocular	94,3	1,97
Nº30 vaginal	4,2	2,53
Nº30 nasal	1,8	2,07
Nº30 ocular	12,2	1,88
Nº31 vaginal	3,3	1,59
Nº31 nasal	4,2	2,13
Nº31 ocular	28,5	2,09
Nº32 vaginal	3,9	2
Nº32 nasal	5,3	2
Nº32 ocular	10,9	2,01
Nº33 vaginal	5,4	2,01
Nº33 nasal	4,2	1,74

Nº33 ocular	53,6	1,84
Nº34 vaginal	2,4	2,27
Nº34 nasal	2,3	2,01
Nº34 ocular	127,7	1,92
Nº35 vaginal	3,8	2,69
Nº35 nasal	7,1	2,21
Nº35 ocular	231,1	1,93
Nº36 vaginal	2,5	2,15
Nº36 nasal	3,9	2,14
Nº36 ocular	33	1,96
Nº37 vaginal	2,9	2,64
Nº37 nasal	3,1	1,93
Nº37 ocular	35,8	1,9
Nº38 vaginal	1,1	1,27
Nº38 nasal	2,4	2,17
Nº38 ocular	49,5	1,98
Nº39 vaginal	122,7	1,87
Nº39 nasal	4,5	1,88
Nº39 ocular	-3,5	1,48
Nº40 vaginal	1,5	-29,83
Nº40 nasal	7	2,14
Nº40 ocular	13,5	1,86
Nº41 vaginal	21,5	1,56
Nº41 nasal	21,1	1,8
Nº41 ocular	7,4	2,09
Nº42 vaginal	2,3	2,2
Nº42 nasal	2,7	1,2
Nº42 ocular	27,6	1,95
Nº43 vaginal	4,9	1,64
Nº43 nasal	10,1	1,67
Nº43 ocular	85,1	1,92
Nº44 vaginal	13,9	1,84
Nº44 nasal	7,4	1,76
Nº44 ocular	155,6	1,9
Nº45 vaginal	6,7	1,67
Nº45 nasal	7,7	2,01
Nº45 ocular	56,3	1,98
Nº46 vaginal	35,5	1,77
Nº46 nasal	21,2	1,58
Nº46 ocular	111	1,93
Nº47 vaginal	4,1	1,62
Nº47 nasal	7,3	1,74
Nº47 ocular	4,1	2,06
Nº48 vaginal	4,9	2,36
Nº48 nasal	7,7	1,49
Nº48 ocular	5,3	1,63
Nº49 vaginal	5,9	1,91
Nº49 nasal	22,3	1,9
Nº49 ocular	5	2,09